



Sommaire

TECHNIQUES UTILISÉES EN AUTO-IMMUNITÉ

Immunofluorescence indirecte. <i>Joëlle GOETZ, Alain CHEVAILLER</i>	1
Les méthodes de double immunodiffusion en milieu gélifié. <i>Pascale CHRÉTIEN</i>	5
Les radio-immunodosages ont-ils encore une place dans notre pratique quotidienne ? <i>Françoise FORTENFANT, Sylvain DUBUCQUOI</i>	7
Techniques ELISA en auto-immunité. <i>Catherine JOHANET, Éric BALLOT</i>	10
L'immunodot. <i>René-Louis HUMBEL</i>	12
Principe, avantages et inconvénients de la technique d'immunotransfert dans le cadre de la détection des autoanticorps. <i>Nicole FABIEN, Jean-Claude MONIER</i>	14
Biopuces à autoantigènes pour la caractérisation des autoanticorps dans les maladies auto-immunes. <i>Chantal ANDRÉ</i>	19
La technologie Luminex® : application à la recherche des autoanticorps. <i>Nils-Olivier OLSSON</i>	23
Apport de l'analyse sérologique du protéome dans l'identification des autoantigènes. <i>Éric BALLOT, Catherine JOHANET</i>	28
Liste des membres	32

Immunofluorescence indirecte

Joëlle GOETZ, Laboratoire d'Immunologie, CHU Hautepierre, 67098 Strasbourg Cedex

Alain CHEVALLER, Laboratoire d'Immunologie et d'Immunopathologie, CHU, Hôpital Larrey, 49033 Angers

L'immunofluorescence indirecte (IFI) représente la technique maîtresse de dépistage des autoanticorps puisqu'elle permet la détection de la plupart des anticorps (Ac) utiles au diagnostic, pronostic et suivi des maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organe (Tableau 1).

HISTORIQUE

Dès 1936, Albert Hewitt Coons (1912-1978), médecin biologiste, professeur de bactériologie et d'immunologie de l'école de Harvard, cherche à colorer les anticorps pour rechercher leur cible [2]. En 1942, grâce à des anticorps marqués à la fluorescéine par ses amis chimistes, il réussit à mettre en évidence des antigènes pneumococciques dans les lésions de rhumatisme articulaire aigu. Ce tour de force marque le début de sa gloire. Il interrompt ses travaux pendant la guerre et finalise la technique d'immunofluorescence au début des années 50. Cette mise au point va révolutionner le monde de la biologie médicale, en particulier celui de la sérologie et de l'auto-immunité.

En 1957, naît le dépistage des anticorps antinucléaires par immunofluorescence [8]. Grâce à une lampe UV récupérée dans un avion de la seconde guerre mondiale et un Ac anti-immunoglobulines humaines marqué par de la fluorescéine dans des conditions dangereuses (utilisation de phosgène), George Friou, chef du service des maladies infectieuses de l'hôpital de West Haven (Connecticut), montre que le sérum des lupiques se fixe sur le noyau des cellules [4]. La même année, Anderson décrit les Ac anti-surrénales, puis en 1961 Beck décrit les premiers aspects de fluorescence des Ac antinucléaires [1], en 1962 Taylor les Ac anti-cellules pariétales gastriques, en 1965 Walker les Ac anti-mitochondries...

Avec la mise sur le marché des microscopes à fluorescence à la fin des années 60, l'immunofluorescence s'est généralisée dans les laboratoires et de nombreux autoanticorps ont été découverts : anticorps anti-LKM (Rizzetto, 1973), îlots de Langerhans (Bottazzo, 1974), ANCA (Davies, 1982 et Van der Woude, 1985), cytosol hépatique (Martini, 1989), ASCA (1998) ... [9].

PRINCIPE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

L'IFI utilise les propriétés de la réaction antigène/anticorps. Un anticorps possède la propriété unique, par son paratope ou site anticorps, de se combiner spécifiquement à l'épitope ou déterminant antigénique d'un antigène, que celui-ci soit exogène ou endogène (autoantigène en ce cas).

L'IFI s'effectue en deux temps : le complexe antigène-anticorps est révélé par un anticorps marqué spécifique de l'isotype du premier anticorps. Lors d'une première incubation, le sérum du patient, source potentielle des autoanticorps, est mis au contact d'un substrat (tissus ou cellules déposés dans les puits d'une lame de microscope). Après lavage, pour éliminer les protéines fixées faiblement de manière non spécifique, une deuxième incubation est réalisée avec un antiserum spécifique des immunoglobulines humaines marqué par un fluorochrome.

Les fluorochromes sont des substances qui ont pour propriétés d'émettre une fluorescence dans le visible lorsqu'ils sont excités par une lumière dans les longueurs d'onde de l'ultra-violet. Trois sont d'utilisation courante : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et la rhodamine. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé en épillumination.

FACTEURS INFLUENÇANT L'IFI

La recherche des autoanticorps s'effectue le plus souvent en première intention par IFI [7]. L'utilisation de différents types de substrats (coupes congelées d'organes de rat, de cobaye, voire de singe, ou cellules humaines en culture, telles que les cellules HEP-2 [carcinome laryngé]) permet la mise en évidence des différents autoanticorps dont on précisera le titre et l'aspect de fluorescence.

Eu égard à l'hétérogénéité des immunoglobulines au sein desquelles s'expriment quelques clones auto-immuns, les résultats de ces tests d'IFI ne peuvent être rendus en unités de masse. On est obligé de définir une valeur seuil au-delà de laquelle la fluorescence observée avec le sérum étudié est significativement différente de l'aspect donné par un sérum humain normal et considérée comme positive. Le titre de l'anticorps se définit comme l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive.

L'objectif de l'IFI est de visualiser l'interaction de l'autoanticorps avec son antigène cible à travers un système de révélation nécessitant une interprétation [12, 14].

Le devoir du biologiste est de maîtriser la connaissance de tous les paramètres pour produire, à partir des faits observés, une conclusion qui ne soit pas erronée. L'absence de réaction positive ne signifie pas l'absence d'autoanticorps, de même que l'existence d'une fluorescence ne signe pas à tout coup leur présence.

► Paramètres liés au substrat

La cible, le substrat, est le premier élément à prendre en compte. C'est une tautologie que d'affirmer qu'il doit contenir l'autoantigène, dans sa bonne conformation épitopique. C'est l'avantage de l'IFI sur les tests en phase solide (ELISA, immunodot) que d'offrir les cibles, qui sont souvent des complexes macromoléculaires [10], sous leur conformation native dans leur milieu « naturel ». Les anticorps non spécifiques d'organes peuvent être recherchés sur des tissus de rongeurs, alors que ceux spécifiques d'organes demandent des tissus de primates comme substrats.

Il peut arriver que l'autoantigène soit masqué par des molécules combinées, nécessitant le traitement préalable de la coupe par un agent dénaturant (urée par exemple), comme c'est le cas pour la recherche des anticorps anti-membrane basale glomérulaire sur rein de singe.

La nature du substrat est un paramètre, sa préparation en est un autre. Qu'importe que l'autoantigène soit présent si la fixation du substrat le fait disparaître ! L'exemple typique en est l'antigène Ro/SS-A particulièrement sensible aux mélanges d'alcools utilisés pour fixer les lames de cellules HEP-2 [5].

La bonne pratique est donc, pour les substrats (tissus ou cellules), de tester les lames à chaque changement de lot en appréciant les paramètres critiques (richesse et morphologie cellulaire, nombre de cellules en mitoses pour les cellules HEP-2, distribution et qualité des différents tissus) vis-à-vis de sérums témoins validés car de spécificité connue.

► Paramètres liés au sérum

La recherche des autoanticorps s'effectue sur du sérum qui peut être conservé au maximum 48 heures à + 4 °C, ou congelé à

– 20 °C pour des périodes de conservation plus longues. Il est classique de diluer le sérum dans du tampon phosphate salin (0,01 M pH 7,4, 0,15 M NaCl) additionné éventuellement de Tween 20 (0,05 %) et d'albumine bovine (2 %) pour diminuer la fluorescence non spécifique [3]. La dilution de dépistage varie avec chaque autoanticorps, le bruit de fond étant donné par un sérum humain normal à la même dilution passé obligatoirement dans chaque série. Une étude a ainsi montré que 13,3 % des sérums de sujets sains possédaient des anticorps antinucléaires au titre du 1/80^e, classique dilution de dépistage pour ce type d'autoanticorps [15].

Concernant le titre et la pratique de dilution de dépistage, il faut garder à l'esprit la possibilité du phénomène de prozone [14] s'expliquant, pour les anticorps de titre très élevé, par l'inaccessibilité des épitopes isotypiques pour le conjugué quand il y a trop d'autoanticorps fixés, et entraînant donc une fausse négativité : ceci est bien connu pour les anticorps anti-mitochondries [11].

L'interprétation d'une recherche positive doit tenir compte de l'âge : si la présence d'anticorps antinucléaires, détectés par IFI sur cellules HEP-2, au titre du 1/100^e est quasi physiologique chez un adulte âgé, il n'en est pas de même chez l'enfant. L'interprétation des fluctuations de titre doit être prudente (*cf. infra*).

► Paramètres liés au conjugué

Il n'y a pas de consensus concernant la spécificité du conjugué. Il peut être polyvalent, reconnaissant les trois isotypes principaux (IgG, IgA et IgM : anti- γ , anti- α et anti- μ) ou restreint à la seule classe IgG (anti- γ) parce que la majorité des autoanticorps immuns, et donc pathologiques, sont de cet isotype. Avec ce deuxième type de conjugué, on risque de passer à côté de la majorité des autoanticorps monoclonaux, qui sont le plus souvent de nature IgM, et qui ne sont pas exceptionnels [14]. Certains font appel à des conjugués anti-IgG totaux à la fois anti- γ et anti-chaînes légères qui vont révéler les IgG, mais aussi les IgA et les IgM grâce aux anti-chaînes légères.

Si l'on n'utilise pas le conjugué de la trousse commerciale, il importe à chaque lot de définir la dilution optimale d'utilisation. Une fois dilué, il faut prendre soin de centrifuger le conjugué pour éliminer les agrégats, sources de fluorescence parasite. Pour les coupes d'organes de primates, il est nécessaire d'utiliser un anti-sérum anti-globulines préalablement adsorbé avec des extraits d'organes de primates. Aucun consensus n'existe sur l'adjonction d'un contre-colorant comme le bleu d'Evans pour faciliter la lecture.

► Paramètres liés à la lecture au microscope

La lecture se fait avec un microscope UV équipé en épiillumination d'une lampe à vapeur de mercure et permettant un grossissement minimum de 400. La maintenance de cet outil est un facteur clef de la qualité de la lecture (réglage du faisceau lumineux, degré d'usure de la lampe). Néanmoins, la lecture reste observateur-dépendante, certains lecteurs étant plutôt lynx et d'autres plutôt taupes. L'entraînement des techniciens et des biologistes doit faire en sorte qu'il n'y ait pas plus d'une dilution de différence entre deux personnes pour une même lecture.

Lecture à sec ou à immersion, voilà encore un sujet de débat, le plus important étant peut-être l'habitude de lecture et le façonnage de l'œil.

► Avantages et inconvénients de l'IFI

Les avantages de l'IFI sont nombreux :

- **facilité d'exécution** : deux incubations de 30 minutes entrecoupées de lavages, ne nécessitant que des dilutions du sérum à tester. À l'heure actuelle, l'IFI est rendue encore plus facile grâce aux automatismes de préparation de lames de fluorescence qui sont capables de réaliser les dilutions des échantillons à tester, le dépôt des dilutions effectuées et du conjugué sur les lames, les incubations et lavages des lames [6] ;

- **sensibilité** : l'IFI est environ 100 fois plus sensible que l'immunoprécipitation, comme le démontre la mise en évidence, à l'aide d'antisérums spécifiques de chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines, d'autoanticorps monoclonaux, alors même qu'il n'existe pas d'anomalie détectable à l'immunoélectrophorèse ou à l'immunofixation [13] ;
- **possibilité de détecter plusieurs anticorps en même temps**, puisque par définition le substrat est une mosaïque d'antigènes. Contrairement aux tests en phase solide où le plus souvent un seul antigène (ou un petit nombre d'antigènes définis) est couplé au support, l'IFI offre l'avantage de pouvoir répondre au-delà de la question posée par le clinicien. Ainsi, dans le cas d'une suspicion de lupus, il est certes important de répondre, par IFI sur cellules HEP-2, à la question de savoir s'il existe ou non des anticorps antinucléaires, mais il peut être également intéressant de signaler la présence d'anticorps anti-ribosomes ;
- **maintien de l'antigène dans sa conformation native et quasi assurance de détecter les autoanticorps dirigés contre tous les types d'épitopes, séquentiels et conformationnels.**

Les prérequis indispensables à l'IFI ne peuvent être appelés inconvénients qu'en cas de manque de disponibilité pour y satisfaire. Ils ne sont mis en avant que si le gain de productivité est le seul moteur du biologiste, comme c'est l'idéologie dominante au USA. Ces prérequis sont :

- l'investissement dans un microscope à fluorescence avec des objectifs de qualité ;
- le caractère non automatisable pour la totalité de la méthode avec le nécessaire contrôle de qualité de chaque étape ;
- l'expertise de lecture indispensable à une interprétation pertinente des résultats.

S'il utilise des réactifs commerciaux, le biologiste doit en connaître toutes les caractéristiques pour pouvoir interpréter avec pertinence les résultats. Les industriels doivent donc jouer la transparence et les mettre à disposition dans les notices techniques d'accompagnement (nature des antigènes, du conjugué, adsorption, fixation, etc.).

Compte tenu de tous les paramètres mis en jeu en IFI, pour les anticorps dont le titre peut être en corrélation avec l'activité clinique d'une maladie, seule une variation d'au moins trois dilutions entre deux titrages doit être considérée comme significative si l'on veut comparer les résultats de deux sérums d'un même patient prélevés et analysés à deux dates différentes.

► Contrôle de qualité

De tout ce qui précède, il est évident qu'il ne peut qu'exister des variations inter-laboratoires compte tenu de tous les paramètres mis en jeu. Ces variations doivent être soigneusement encadrées par des contrôles de qualité : internes, avec des témoins positifs et négatifs systématiques dans chaque série, externes comme le programme de contrôle de qualité national mis en place par l'AFSSaPS depuis 1997.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats doit tenir compte non seulement des données microscopiques mais aussi du contexte clinique et/ou biologique qui a nécessité la prescription d'une recherche d'autoanticorps.

1. DONNÉES MICROSCOPIQUES

La lecture au microscope à fluorescence constitue l'étape ultime de la technique d'immunofluorescence indirecte.

La caractérisation des anticorps présents dans le sérum des patients est basée sur plusieurs paramètres : la nature, la localisation et parfois aussi la comparaison des intensités de la fluorescence dans les tissus ou/et cellules utilisées que l'on résume sous

le terme d'aspect de la fluorescence ou *pattern*. Elle nécessite une parfaite connaissance de la structure histologique et/ou cytologique du substrat utilisé.

Le plus souvent, d'autres techniques sont nécessaires pour identifier les anticorps détectés (*Tableau 1*). C'est l'aspect de la fluorescence sur le substrat qui va orienter les examens complémentaires qui permettront de définir leur cible exacte : Ac anti-PR3 et anti-MPO en cas de fluorescence de type c-ANCA ou p-ANCA, Ac anti-ADN natif en cas de fluorescence de type anti-chromatine sur cellules HEP-2, Ac anti-ENA en cas de fluorescence mouchetée ou homogène des cellules HEP-2 avec ou sans Ac anti-nucléole, Ac anti-cytochrome P450 II D6 en cas de présence d'anticorps anti-réticulum endoplasmique sur coupes de rein-foie-estomac de rat, ...

Parfois, l'image de la fluorescence est suffisamment évocatrice pour que l'on puisse déduire la nature de l'antigène reconnu sans autres investigations : Ac anti-centromère, ASCA, Ac anti-îlot de Langerhans, ...

Pour certains Ac, en particulier les Ac antinucléaires et antithyroïdiens, l'interprétation doit aussi tenir compte du titre de la fluorescence, des titres faibles étant fréquemment retrouvés chez les sujets âgés sans pathologie auto-immune avérée.

Des différences d'interprétation des données microscopiques, parfois importantes, entre les laboratoires existent encore à l'heure

actuelle. Elles sont liées au caractère subjectif de la lecture, aux variations méthodologiques, à l'absence de consensus sur la nomenclature et sur le seuil de positivité de certains Ac, en particulier pour les antinucléaires, et parfois aussi au manque de connaissances approfondies des différents aspects de fluorescence. Tous ces facteurs constituent autant de handicaps à la standardisation des résultats.

Les différences intra-laboratoires peuvent être minimisées par la lecture des lames par deux personnes différentes, l'introduction de contrôles positifs et négatifs dans chaque série et l'automatisation de la technique par des préparateurs de lames qui améliore considérablement la reproductibilité et la répétabilité des tests.

2. LE CONTEXTE CLINIQUE

La signification clinique des autoAc n'est pas univoque.

La plupart des maladies auto-immunes, dont le diagnostic repose sur un ensemble de signes cliniques et d'anomalies biologiques, sont caractérisées par la présence d'autoanticorps. Quand l'interrogatoire et l'examen clinique d'un patient évoquent une maladie auto-immune, certains Ac marqueurs permettent de conforter ou de poser le diagnostic (*Tableau 1*).

La présence d'autoanticorps n'est cependant pas synonyme de maladie auto-immune :

Tableau 1 : Principaux autoanticorps ayant un intérêt clinique et détectés par IFI

ANTICORPS ANTI-	SUBSTRATS	EXAMEN COMPLÉMENTAIRE : IDENTIFICATION DES Ac ANTI-	MALADIES AUTO-IMMUNES ASSOCIÉES
Nucléaires	Cellules HEP-2	Ag solubles du noyau (ENA) ADN natif, nucléosome	Connectivites Lupus systémique
ADN natif	<i>Crithidia luciliae</i>	Non	Lupus systémique
Cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)	Polynucléaires neutrophiles humains fixés à l'éthanol	Protéinase 3 (PR3) Myéloperoxydase (MPO)	Vascularites primitives
Mitochondries de type 2	Rein-foie-estomac de rat	Pyruvate déshydrogénase, BCOADC, OGDC	Cirrhose biliaire primitive
Muscles lisses	Rein-foie-estomac de rat	Actine F	Hépatite auto-immune de type 1
Îlots de Langerhans	Pancréas de primate	Non	Diabète insulino-dépendant
Cellules pariétales gastriques	Estomac de rongeur	Non	Gastrite A, Biermer
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Non	Maladie de Crohn
LKM1	Rein-foie-estomac de rat	Cytochrome P450 II D6 (CYP2D6)	Hépatite auto-immune de type 2
Pancréas exocrine	Pancréas de primate	Non	Maladie de Crohn
Membrane basale glomérulaire	Rein de primate traité par l'urée à pH 3,5	Chaîne alpha-3 du collagène IV (COLIVA3)	Syndrome de Goodpasture
Peau (membrane basale, substance intercellulaire épidermique)	Œsophage de primate	Non	Dermatoses bulleuses (pemphigoïdes, pemphigus)
Neurones	Cervelet de primate	Hu, Yo, Ri, CV2, amphiphysine, Ma	Syndromes neurologiques paranéoplasiques
Myéline	Nerf sciatique de primate (IgM)	MAG (myelin-associated glycoprotein) Sulfatides	DADS GALOP syndrome
Thyroïde	Thyroïde de primate	Thyroglobuline Thyréoperoxydase	Thyroïdite auto-immune (Basedow, Hashimoto)
Endomysium	Œsophage de primate (IgA)	Non	Maladie cœliaque, dermatite herpétiforme
Corticosurrénale	Surrénale de primate	21-hydroxylase	Maladie d'Addison
Cellules stéroïdes	Surrénale, ovaire, testicule de primate, placenta	20,22-desmolase	Polyendocrinopathies

BCOADC : Branched Chain 2-Oxoacid Dehydrogenase Complex.

DADS : Distal Acquired Demyelinating Symmetrical Neuropathy.

GALOP : Gait disorder, Autoantibody, Late-age Onset, Polyneuropathy.

OGDC : 2-Oxo-Glutarate Dehydrogenase Complex.

- nombre d'Ac peuvent être induits par une infection virale aiguë ou chronique (infection à EBV, VHC, Parvovirus B19, ...), ils sont généralement présents à titre faible et transitoires ;
- nombre d'Ac peuvent être induits par des médicaments (bêta-bloquants, certains anti-épileptiques, anti-hypertenseurs, ...). Ils peuvent être présents isolément ou associés à des signes cliniques (lupus induit) et disparaissent après l'arrêt du traitement ;
- certains Ac comme les Ac anti-neurones ou antinucléaires de type pseudo-PCNA sont associés à des cancers ;
- l'âge du malade peut déterminer le seuil de significativité d'un résultat en particulier pour les Ac antinucléaires : leur prévalence augmente avec l'âge, en particulier après 60 ans.

L'âge du malade peut aussi orienter le diagnostic : chez l'adulte, les Ac anti-LKM1 sont essentiellement associés à l'hépatite virale C, alors que chez l'enfant, en particulier de sexe féminin, ils constituent un marqueur de l'hépatite auto-immune de type 2.

L'interprétation d'un résultat positif d'autoanticorps doit donc tenir compte des données cliniques et des examens complémentaires : âge, sexe, antécédents personnels et familiaux, notion de prise médicamenteuse, symptômes cliniques, anomalies biologiques (hypergammaglobulinémie, cytopénie périphérique, ...),

radiologiques associées, ... Ce n'est que de la confrontation clinico-biologique que va résulter un diagnostic, voire un pronostic ou une décision thérapeutique.

Ainsi, dès que le clinicien suspecte l'existence d'une maladie auto-immune, la recherche des Ac marqueurs par immunofluorescence est légitime. Dans bon nombre de cas, l'identification précise de leur cible (*Tableau 1*) apporte plus d'informations. Ces résultats ne seront interprétables qu'une fois intégrés dans le contexte clinique et biologique qui aura justifié leur prescription.

Lorsque le clinicien relève des symptômes pouvant apparaître lors de maladies auto-immunes ou lors d'une affection non auto-immune, la recherche d'autoanticorps par immunofluorescence est effectuée pour confirmer la réalité d'une maladie auto-immune ou pour l'éliminer. L'interprétation des données clinico-biologiques peut alors être rendue difficile par certains pièges diagnostiques :

- les Ac peuvent manquer au début de l'affection et apparaître par la suite ;
- les Ac ne sont pas constants au cours d'une maladie ;
- les Ac peuvent ne pas être détectés en cas de déficit immunitaire (exemple des anticorps anti-transglutaminase et anti-endomysium de classe IgA, marqueurs de la maladie cœliaque pouvant être associée à un déficit sélectif en IgA).

CONCLUSION

L'immunofluorescence indirecte reste à l'heure actuelle la technique de dépistage pour la plupart des autoanticorps. Les images de fluorescence observées donnent une première information sur l'identité de la cible. D'autres méthodes vont permettre l'identification précise de la nature moléculaire de l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps détecté.

La recherche d'autoanticorps doit être confiée à un laboratoire capable de mettre en œuvre l'ensemble des techniques nécessaires à leur détection et leur identification.

Tout résultat doit être interprété en fonction du contexte clinique, d'où la nécessité d'une collaboration étroite entre le médecin prescripteur et le biologiste. Les biologistes doivent parfaitement connaître les limites des techniques et des substrats utilisés et les cliniciens savoir que, dans une maladie donnée, aucun anticorps n'est constant ni spécifique à 100 %.

Références

- [1] BECK JS.
Variations in the morphological patterns of «autoimmune» nuclear fluorescence.
Lancet 1961 ; 1 : 1203-5.
- [2] COONS AH.
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.
J Immunol 1942 ; 45 : 159.
- [3] DEGENNE D.
Les bonnes pratiques de la recherche des anticorps antinucléaires par immunofluorescence sur cellules HEp-2.
OPTION/BIO 1998 ; 220 suppl : 20-1.
- [4] FRIOU GI.
The early days of the antinuclear antibody story: where and how did it all start?
Ann Med Interne (Paris) 1993 ; 144 : p. 154-56.
- [5] GOETZ J.
Anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB. In: MEYER O, ROUQUETTE AM, YOUINOU P, editors. Autoanticorps, marqueurs des maladies auto-immunes.
Paris : BMD éditions ; 1999. p. 129-41.
- [6] GOETZ J, OLSSON NO.
L'automatisation des sérologies auto-immunes.
Biotribune 2004 ; 9 : p. 56-8.
- [7] HUMBEL RL.
Autoanticorps et maladies auto-immunes.
Paris : Elsevier ; 1997. p. 44-5.
- [8] HUMBEL RL.
Histoire des anticorps antinucléaires.
GEAI l'info 1999 ; 2 : p. 1-2.
- [9] HUMBEL RL.
Histoire des autoanticorps. Colloque GEAI 2000.
Spectra Biologie 2000 ; p. 3-6.
- [10] HUMBEL RL.
Stratégie d'étude des anticorps antinucléaires.
Biotribune 2003 ; 7 : p. 18-9.
- [11] LINDER E, MIETTINEN A.
Prozone effects in indirect immunofluorescence.
Scand J Immunol 1976 ; 5(5) : p. 513-19.
- [12] RENIER G, MATTMANN S.
L'auto-immunité au quotidien.
Rev Fr Lab 2000 ; 327 : p. 75-82.
- [13] RENIER G, McILROY A, TANGUY-SCHMIDT A, NEDELLEC R, DANIEL C, CHEVAILLER A.
Monoclonal immunoglobulins discovery in autoantibodies screening using indirect immunofluorescence. Abstracts of the 15th European Immunology Congress (EFIS 2003).
Immunol Lett 2003 ; 87 (1-3) : p. 246-7.
- [14] RENIER G, CHEVAILLER A.
Quelques pièges du diagnostic biologique en immunologie.
Rev Fr Lab 2005 ; 371 : p. 33-40.
- [15] TAN E, FELTKAMP TE, SMOLEN JS, BUTCHER B, DAWKINS R, FRITZLER MJ, *et al.*
Range of antinuclear antibodies in « healthy » individuals.
Arthritis Rheum 1997 ; 40 : p. 1601-11.

Les méthodes de double immunodiffusion en milieu gélifié

Pascale CHRÉTIEN, Service d'Hématologie et d'Immunologie, CHI, 94000 Créteil

Dans ce groupe de méthodes de précipitation en milieu gélifié, les antigènes et les anticorps (Ac) migrent à la rencontre les uns des autres à partir de réservoirs séparés par un gel. Leur progression à travers la gélose s'effectue soit sous l'effet des forces de diffusion spontanées (méthode d'Ouchterlony), soit sous l'influence d'un champ électrique (électrosynérèse). Ces deux méthodes ont été historiquement développées pour le dépistage et l'identification des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles grâce à l'utilisation de sérums étalons.

I / IMMUNODIFFUSION DOUBLE D'OUCHTERLONY

Dans cette technique, la diffusion de l'antigène et de l'anticorps se fait l'un vers l'autre à partir de réservoirs creusés dans une gélose. Généralement, le puits central contient l'extrait antigénique, les sérums à tester étant disposés à la périphérie.

Pour un couple antigène-anticorps donné, l'emplacement de l'arc de précipitation dans le gel est uniquement fonction des coefficients de diffusion des réactants et non pas de la concentration. Cependant plusieurs facteurs influencent la précipitation :

- la qualité de la gélose ;
- le pH et la température ;
- la nature de l'antigène ;
- les concentrations des constituants qui influencent le délai d'apparition.

Cette méthode s'applique en auto-immunité à l'analyse qualitative d'un mélange d'anticorps parfois complexe. L'apparition de plusieurs lignes de précipitation indique la présence d'un nombre au moins égal de couples antigène-anticorps (certaines pouvant se superposer). Elle permet en outre d'identifier les anticorps en comparant leurs réactivités vis-à-vis de celles obtenues avec des sérums étalons monospécifiques dits « sérums de référence ». Ainsi, en comparant les arcs formés par les deux systèmes antigène-anticorps, il est possible de déduire leur parenté (Figure 1) :

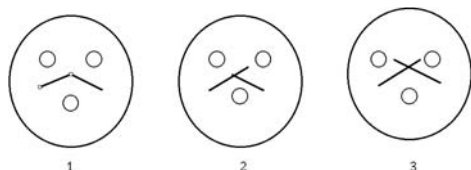


Figure 1 / Schéma des réactions d'identité totale (1), partielle (2) et de non identité (3) par immunodiffusion double d'Ouchterlony.

Le puits du bas reçoit la préparation antigénique, et les puits du haut reçoivent les sérums (sérum à tester et sérum de référence).

- si les arcs se croisent sans interférer, les deux systèmes ne sont pas identiques et, par voie de conséquence, les anticorps contenus dans le sérum à tester ne sont pas identiques à ceux de l'étalon. Il s'agit d'une réaction de non identité ;
- les lignes de précipitation issues des deux couples fusionnent et se raccordent pour ne former qu'une ligne continue : les anticorps sont identiques. C'est une réaction d'identité ;
- les arcs issus des deux systèmes antigène-anticorps se raccordent en donnant une image en éperon : les couples sont partiellement apparentés. Il s'agit d'une réaction d'identité partielle. Cette dernière est rarement mise à profit en auto-immunité où seule la réaction d'identité est recherchée.

Dans le passé, cette technique a été très largement utilisée pour la recherche des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles (Ac anti-ENA). Cependant, elle a vu son intérêt diminuer au profit de techniques plus sensibles comme l'ELISA, soit en microplaque, soit sur bandelettes (immunodot).

Elle reste cependant souvent utilisée en première intention pour la recherche de ces autoanticorps, recherche complétée par une méthodologie plus sensible.

Les antigènes utilisés sont principalement un extrait de thymus de veau ou de lapin dont la préparation s'effectue au laboratoire. Cependant, ces derniers ne contenant pas l'antigène SS-A (Ro), les Ac correspondant seront recherchés sur un autre substrat comme un extrait de rate humaine ou de primate. La commercialisation d'extrait antigénique polyvalent (contenant la plupart des cibles d'autoanticorps) permet une seule réaction par sérum.

Ainsi, cette méthode a été étendue à la recherche d'Ac dirigés contre des antigènes nucléaires insolubles (Scl-70), cytoplasmiques (Jo-1), ou encore très rares (Ku, PCNA).

De même, elle est utilisée pour rechercher et identifier des Ac dirigés contre un constituant du cytoplasme comme les Ac anti-ribosome, anti-LKM1 ou anti-LC1 en utilisant les extraits antigéniques adéquats. La Figure 2 présente la recherche d'Ac anti-LC1 par immunodiffusion à l'aide d'un extrait de foie de rat.

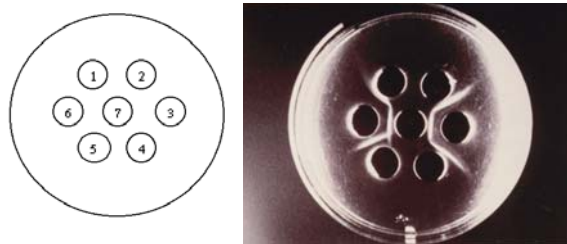


Figure 2 / Application de l'immunodiffusion double à la recherche et à l'identification d'Ac anti-LC1 à l'aide d'un extrait de foie de rat.

L'extrait antigénique est déposé dans les puits 3 et 6. Le sérum de référence est déposé dans le puits central (7), et les sérums à tester dans les puits 1, 2, 4 et 5. La fusion des traits de précipitation indique la présence d'Ac anti-LC-1 dans les sérums déposés en 1, 2 et 4. Le sérum déposé en 5 donne une réaction de non identité avec le sérum de référence.

Le principal inconvénient de l'immunodiffusion double d'Ouchterlony reste son manque de sensibilité. Il lui a longtemps été reproché de ne mettre en évidence que des anticorps précipitants. Cependant, ce problème se pose peu en auto-immunité puisque la grande majorité des anticorps incriminés sont soit des IgG, soit plus rarement des IgM, ces deux isotypes étant en général précipitants. Il faut souligner qu'un certain nombre d'autoanticorps ont été définis par cette réaction de précipitation avec un

extrait antigénique. C'est le cas par exemple des anti-PL-7 ou anti-PL-12 associés aux polymyosites : PL désigne précipitin line.

Parfois, la lecture peut être délicate, notamment si deux arcs se superposent. Dans ce cas, il faut soit changer de technique, soit diluer le sérum afin de séparer les traits de précipitation.

Enfin, cette technique ne convient pas aux dépistages urgents. En effet, il est nécessaire d'effectuer plusieurs lectures des boîtes de gélose à 24, 48 et 72 heures, la cinétique de formation des complexes variant d'un système antigène-anticorps à l'autre.

Malgré ces inconvénients, l'immunodiffusion double reste encore utilisée du fait de sa facilité de mise en œuvre et de son faible coût, notamment pour les préparations antigéniques faites maison.

II/ L'ÉLECTROSYNÈRE

Dans cette technique essentiellement qualitative, antigènes et anticorps sont déposés dans des réservoirs creusés dans une plaque de gélose où ils migrent à la rencontre l'un de l'autre sous l'influence d'un champ électrique.

Ici, la migration n'est plus uniquement gouvernée par les coefficients de diffusion, mais par les mobilités électrophorétiques. Cette migration forcée accélère l'apparition des arcs de précipitation.

Les conditions opératoires doivent être telles que les charges électriques des antigènes et des anticorps doivent être de sens inverse. Le pH sera choisi afin d'être à mi-chemin des points isoélectriques. La lecture reprend les principes énoncés pour l'immunodiffusion : le nombre de systèmes antigène-anticorps est au moins égal à celui du nombre d'arcs de précipitation. Une réaction d'identité vis-à-vis d'un sérum monospécifique de référence est recherchée.

Cette technique reste utilisée dans certains laboratoires pour la recherche et l'identification des Ac anti-SS-A (Ro). Elle serait plus sensible que l'immunodiffusion double d'Ouchterlony, cependant elle présente plus de difficultés techniques dans sa réalisation. En effet, il faut choisir soigneusement le pH réactionnel. En outre, il faut disposer d'un appareillage adapté avec cuve de migration et générateur électrique, si bien qu'en pratique elle reste moins utilisée que la simple immunodiffusion.

Les radio-immunodosages ont-ils encore une place dans notre pratique quotidienne ?

Françoise FORTENFANT, Laboratoire d'Immunologie, CHU PURPAN de Toulouse, fortenfant.f@chu-toulouse.fr
Sylvain DUBUCQUOI, Laboratoire d'Immunologie, CHRU de Lille, s-dubucquoi@chru-lille.fr

La compréhension des mécanismes d'interaction entre une molécule cible (par exemple, un antigène) et un récepteur spécifique (un anticorps) a très vite trouvé des applications pratiques à partir du moment où l'on pouvait tracer le comportement de l'un des deux protagonistes présents dans la réaction. Historiquement, la méthode de marquage la plus simple consistait à utiliser un isotope radioactif, traceur qui ne modifie en rien le comportement de la molécule marquée. Les méthodes radio-immunologiques ont été utilisées dès 1959 pour des dosages hormonaux (Yalow et Berson, 1959, pour l'insuline [1, 2]). Leur grande sensibilité permettant la quantification de substances présentes à de très faibles concentrations, leur utilisation s'est ensuite étendue à d'autres domaines de la biologie médicale et notamment en immunologie pour l'exploration de l'allergie (on parle d'ailleurs encore de RAST, *Radio[active] Allergo Sorbent Tests*) et la quantification des autoanticorps (autoAc). L'expansion des radio-immunodosages a suivi une courbe exponentielle jusque dans les années 80, le marquage étant adapté aux dosages par compétition (phase hétérogène) en milieu liquide (*Figure 1*). D'autres méthodes utilisent également des traceurs radioactifs (IRMA : immunoradiometric assay) mais la réaction ne s'effectue plus à l'équilibre mais dans une situation où un anticorps (Ac, en excès) est fixé à une phase solide, et prend l'antigène en « sandwich » avec un autre Ac radiomarké reconnaissant un épitope différent (méthode immunométrique à 2 sites). Cette méthode nécessite donc un antigène avec deux épitopes accessibles pour des Ac de haute affinité (*Figure 2*).

En contrepoint de ces grandes performances analytiques, la radio-immunologie (RIA, radioimmunoassay) pose des difficultés importantes. La nécessité de locaux répondant à des normes strictes de sécurité constitue son principal inconvénient. En effet, ces locaux doivent être adaptés pour obtenir l'agrément de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), en appui technique de la direction générale de la sûreté nucléaire et de la radioprotection (DGSNR). Le personnel doit être formé aux règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et doit être soumis à une surveillance médicale annuelle. Le matériel technique doit être réservé à cette activité. Certains tests requièrent du matériel spécifique, notamment une centrifugation à haute vitesse (au moins 2 000 g), le comptage s'effectuant après précipitation des immuns complexes. Le stockage et l'élimination des déchets répondent également à des règles précises, liées à la décroissance isotopique. Leur gestion est particulièrement coûteuse. L'infrastructure est donc contraignante et onéreuse, même si, avec les trousse commerciales, la radioactivité est généralement faible et le radio-isotope fixé (donc non volatil), ce qui présente peu de risques de contamination. La décroissance plus ou moins rapide de l'activité du radioélément et la « radiolyse » (dégradation des réactifs, notamment protéiques, par le rayonnement ionisant) représentent d'autres inconvénients. Il est préférable d'effectuer les dosages dans des délais rapides après la réalisation du marquage.

À partir des années 1980, l'apparition des traceurs froids (notamment enzymatiques) a révolutionné l'approche méthodologique

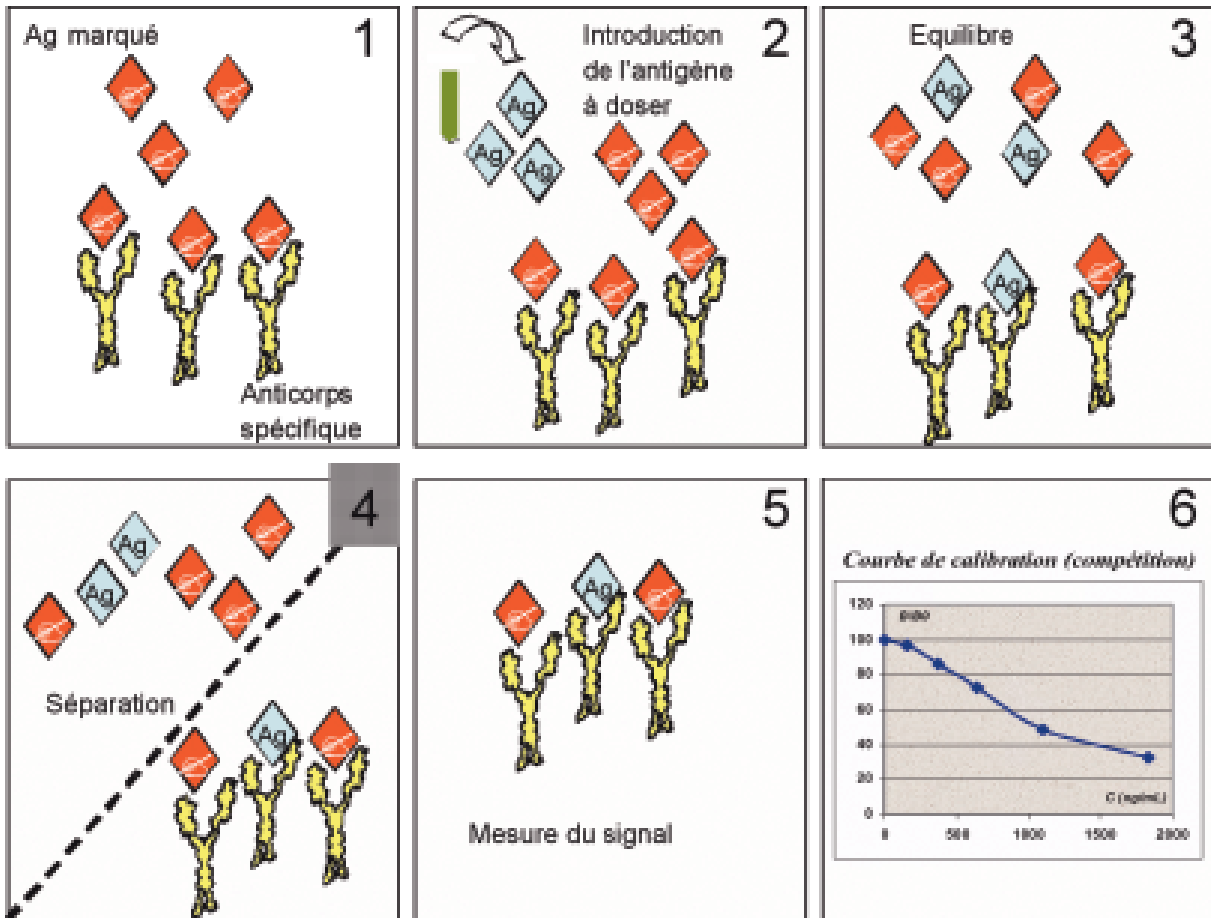


Figure 1 / Immunodosage par compétition.

Les différentes étapes d'une méthode de dosage en phase hétérogène par compétition.

1) En l'absence d'antigène (Ag) à doser, l'Ag marqué (en excès) est le seul à interagir avec l'anticorps spécifique (en quantité limitée et précisément définie) (B/B0).

2) Introduction de l'antigène à doser.

3) À l'équilibre (temps d'incubation), l'antigène à doser a déplacé l'antigène marqué de l'anticorps, dans une proportion d'autant plus importante que sa concentration dans l'échantillon à doser est élevée.

4) Séparation des molécules d'antigènes liées à l'Ac des molécules d'antigènes libres (précipitation).

5) Mesure du signal (^{125}I et ^{32}P : émission gamma ; ^3H : émission bêta).

6) Courbe de calibration : le signal mesuré est inversement proportionnel à la quantité de l'analyte à doser.

des immunodosages, et relégué la RIA à quelques cas d'espèces, en voie de disparition. Il est vrai que la balance « coût-bénéfice » des différentes méthodes penche au détriment des radio-isotopes (Tableau I) et des principes méthodologiques qui leur sont généralement associés (Tableau II).

En 2005, quelle place reste-t-il pour la RIA ? Dans la grande majorité des cas, cette approche est devenue le parent pauvre des immunodosages. Plus aucune méthode n'est développée à partir de tels traceurs écologiquement indésirables ! Presque tous les tests basés sur l'utilisation des traceurs radioactifs ont été convertis en dosages utilisant des traceurs froids, d'utilisation plus aisée et plus automatisables. Ne persistent donc en RIA que quelques tests très spécialisés à indications restreintes, réservés à certains centres dont le recrutement est suffisant pour justifier leur utilisation, comme les dosages d'anticorps anti-récepteurs (acétylcholine, TSH par exemple). La persistance d'un test utilisant un traceur radio-isotopique peut également se justifier par le fait que les performances des tests utilisant des traceurs froids et sensés remplacer la première génération de RIA ne sont pas suffisantes pour totalement la supplanter. Jusque très récemment, la radio-immunologie était la méthode de choix pour la recherche d'autoAc dans le cadre du diabète insulino-dépendant. En effet, les tests en phase liquide sont particulièrement adaptés aux anticorps anti-insuline qui reconnaissent des déterminants présents sur la

molécule en configuration native. Il faut au préalable dissocier les complexes insuline - Ac anti-insuline qui peuvent être présents dans le sérum du patient à la phase initiale de la maladie. Cette étape est suivie de l'élimination de l'insuline endogène afin qu'elle n'entre pas en compétition avec l'insuline radiomarquée. Dans le diabète, toujours, la recherche d'Ac anti-glutamate décarboxylase (GAD) répond aux mêmes exigences méthodologiques, car ces Ac réagissent en phase liquide avec des épitopes conformationnels présents sur la molécule native. Une méthode immunoenzymatique originale a toutefois été récemment développée (RSR, Cardiff, UK) et semble donner une qualité de résultats comparable à la radio-immunologie.

Un autre cas de figure est rencontré avec le test de Farr, là encore dans le domaine de l'auto-immunité. Les performances de ce test ne sont pas tant liées au traceur (^{125}I) qu'à la méthode de séparation des Ac liés à l'ADN natif. En effet, la concentration du sulfate d'ammonium, utilisé pour précipiter les complexes immuns, est telle que seuls les Ac anti-ADN natif de forte avidité (quel que soit leur isotype) sont précipités et mesurés. Une « aura » de plus grande spécificité lui est associée. Le test de Farr pourrait donc encore trouver des applications dans le suivi des patients lupiques, permettant notamment d'apprécier l'activité de la maladie lupique ou le risque de poussées [3].

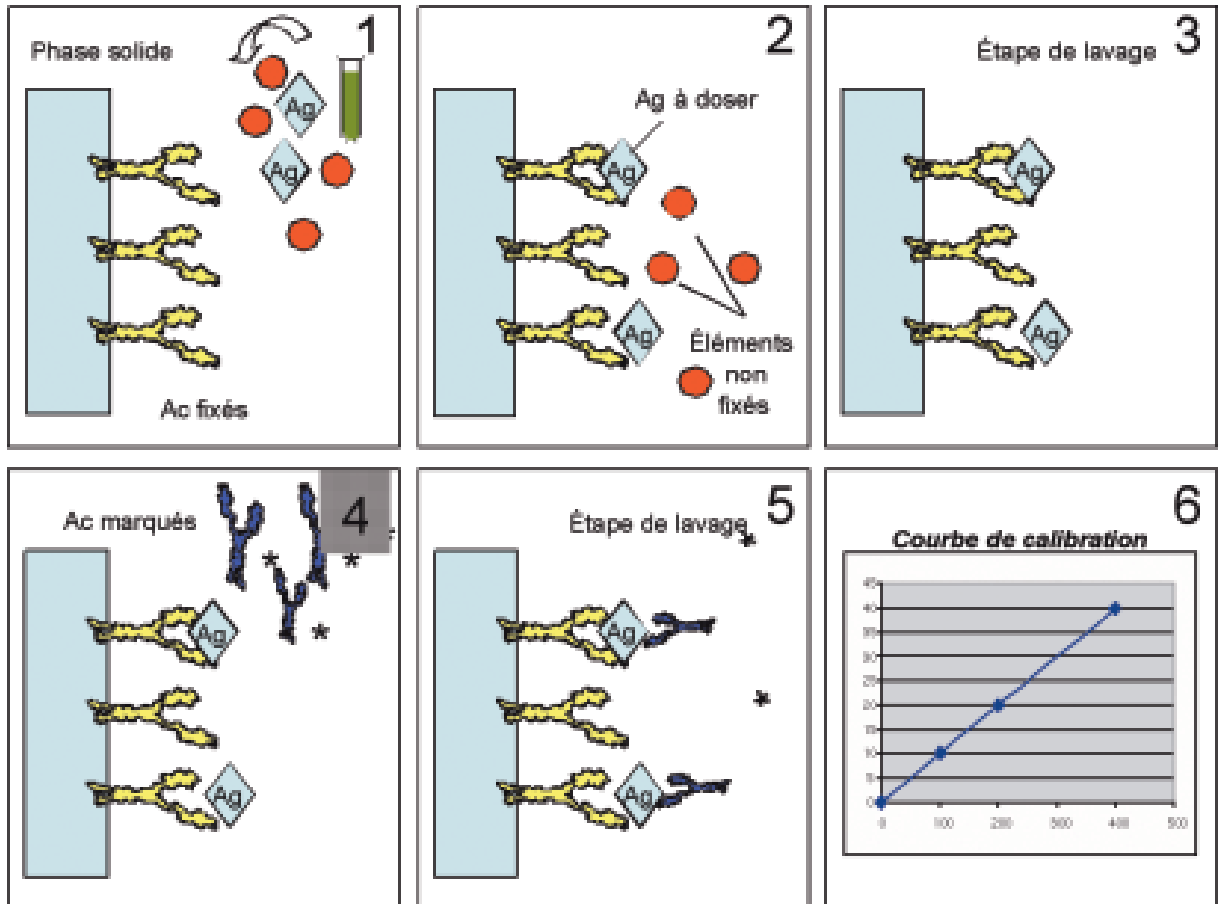


Figure 2 / Dosage « sandwich ».

Les différentes étapes d'une méthode de dosage immunométrique à 2 sites.

1) L'anticorps (Ac) en excès est fixé à une phase solide, et l'analyte (antigène) à doser est introduit.

2) Interaction entre l'Ac et un épitope de l'antigène (Ag).

3) Le lavage permet d'éliminer les éléments qui n'ont pas interagi avec les Ac fixés.

4) Introduction des Ac marqués par le radio-isotope.

5) Après incubation, lavage pour éliminer l'excès d'Ac marqués, et mesure du signal.

6) Courbe de calibration : le signal mesuré est directement proportionnel à la quantité de l'analyte à doser.

Cette méthode de dosage présente de nombreux avantages par rapport aux dosages compétitifs. Elle présente notamment une sensibilité accrue par la présence d'Ac en excès. La vitesse de réaction est également accélérée par l'excès d'Ac (réduction du délai de rendu de résultat). Enfin, la zone de travail est plus grande (plus large gamme de mesure). La précision au pipetage est moins contraignante, l'étape cruciale étant l'introduction de l'échantillon à doser. La réalisation du blanc est facile : il suffit de ne pas immobiliser d'Ac sur la phase solide.

Le principal inconvénient est lié à l'existence d'effets « crochets » pour les concentrations élevées.

Tableau 1 / Avantages et inconvénients liés à l'utilisation de traceurs isotopiques

Avantages	Inconvénients
Simplicité du marquage (iodination)	Toxicité
Pas de modification du comportement de la molécule tracée	Environnement
Grande spécificité du signal (peu de bruit de fond)	Péremption rapide (radiolyse, décroissance)
Grande sensibilité de la détection	Législation
Précision de la mesure	Coût
	Pas (peu) d'automatisation

Tableau 2 / Avantages et inconvénients de la méthode d'immunodosage par compétition en milieu liquide généralement associée aux traceurs isotopiques

Avantages	Inconvénients
Adaptée aux dosages de petites molécules (hormones)	Manque de précision aux 2 extrémités de la courbe de calibration (<i>faibles et fortes concentrations d'analytes à doser</i>) Gamme de mesure limitée Précision requise à chaque étape de manipulation (pipetages, lavages, ...) Blanc échantillon parfois difficile à réaliser.

Références

[1] HARRIS C.
RIA, death, and the Nobel Prize.
N Engl J Med 1982 ; 307 : 1462.

[2] YALOW RS, BERSON SA.
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature 1959 ; 184 : 1648-69.

[3] SPRONK PE, LIMBURG PC, KALLENBERG CG.
Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus.
Lupus 1995 ; 4 : 86-94.

Techniques ELISA en auto-immunité

Catherine JOHANET, Eric BALLOT,

Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie Biologiques, hôpital Saint-Antoine, Paris

Le nombre d'autoanticorps (AAc) identifiés (plus de 200) a considérablement augmenté ces dernières années. Mais c'est surtout l'identification des cibles moléculaires de ces AAc qui a progressé grâce à l'immunocriblage de banques d'ADNc et, très récemment, grâce au développement de l'analyse protéomique.

Aujourd'hui encore, l'immunofluorescence indirecte sur coupe de tissus ou culture cellulaire reste la technique de choix pour le dépistage de la plupart des AAc. Cependant, l'identification des autoantigènes a permis le développement de techniques de seconde intention, monospécifiques, nécessitant l'emploi d'antigènes (Ag) hautement purifiés telles que les techniques ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [3]. Ce sont des techniques relativement récentes, puisqu'elles datent de 1971 [1, 7], et qui ont bénéficié à partir de 1983 des Ag recombinés. La généralisation des techniques ELISA en microplaques s'est accompagnée de leur automatisation (modules séparés puis chaînes modulables ou automates intégrés). De ce fait, elles sont actuellement très largement utilisées pour la détection des AAc.

I/ PRINCIPE

Il s'agit d'un dosage dans lequel un des réactifs (l'Ag ou l'Ac) est adsorbé sur un support plastique. La révélation de la réaction Ag-Ac est possible grâce au marquage du réactif libre par une enzyme. Plusieurs modalités de dosage sont possibles. Dans sa description initiale [1], la technique ELISA était utilisée pour doser un antigène (IgG humaines) et reposait sur le principe de la compétition : l'Ag apporté par le sérum entrainé en compétition avec une quantité définie du même Ag conjugué à une enzyme pour se fixer sur une quantité limitée d'anticorps adsorbés sur le support plastique.

Aujourd'hui, la plupart des techniques immunoenzymatiques en microplaques utilisent le principe du sandwich plutôt que celui de la compétition, et l'utilisation du terme ELISA a été élargie pour désigner toute technique en microplaques utilisant un conjugué enzymatique. Pour la détection d'AAc, le procédé le plus utilisé est celui de ELISA indirect.

1.1. DÉTECTION D'AAc PAR ELISA INDIRECTE

Dans ce procédé, les Ac à doser réagissent dans un premier temps avec l'Ag immobilisé. Dans un deuxième temps, la quantité d'Ac fixé sur l'Ag en excès est mesurée à l'aide d'un deuxième Ac conju-

gué à une enzyme. L'activité enzymatique, et donc la coloration du substrat chromogénique spécifique de l'enzyme est le reflet de la quantité mais aussi de l'affinité des Ac à doser (Figure 1).

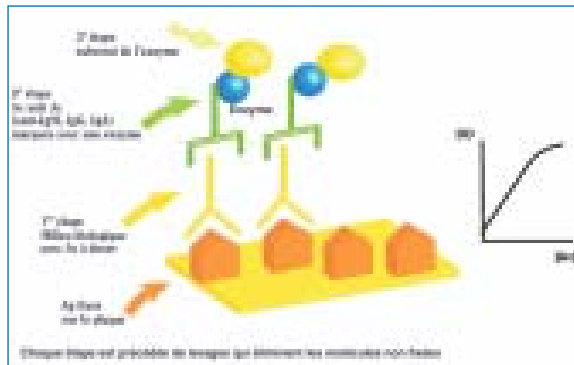


Figure 1 / Détection d'Ac par ELISA indirect.

La plupart des AAC peuvent être caractérisés par cette technique dès lors que l'Ag a été caractérisé et purifié : Ac anti-ADNn, anti-nucléaires solubles, antithyroïdiens, anti-MPO et anti-PR3, anti-gliadine, anti-transglutaminase tissulaire...

1.2. DE NOMBREUSES VARIANTES DE LA TECHNIQUE EXISTENT

Nous en donnerons deux exemples.

► Premier exemple : technique d'immunoextraction-immunosaturation.

La technique de référence utilisée pour la détection des Ac anti-SLA (*soluble liver antigen*) est une variante complexe de l'ELISA [2]. Brièvement, des Ac anti-SLA sont fixés sur une microplaque puis incubés avec une fraction cellulaire contenant l'Ag SLA (cytosol de foie de rat). Les Ac sur la phase solide fixent l'Ag dans cette fraction cellulaire. Après lavages, les Ac du sérum à tester sont épuisés sur l'Ag. Puis, après lavage, on ajoute un large excès d'Ac anti-SLA marqués dont la fixation dépend alors de la saturation des épitopes de l'Ag par les Ac du sérum à tester. L'intensité du signal fourni est donc inversement proportionnelle à la quantité d'Ac contenus dans les sérums à tester (Figure 2). Cette variante permet l'utilisation d'un Ag qui n'est pas hautement purifié.



Figure 2 / Technique d'immunoextraction-immunosaturation.

► Deuxième exemple : ELISA indirect avec capture de l'Ag sous forme liquide par le système avidine-biotine

Une méthode récente (BIOONE®, Zentech), se distingue de l'ELISA indirect classique par l'utilisation d'Ag biotinylés sous forme liquide et d'une microplaque commune recouverte de streptavidine. Pendant la première étape, les Ag biotinylés réagissent avec les Ac du sérum et le complexe Ag-Ac se fixe à la streptavidine adsorbée à la microplaque. Les étapes suivantes, fixation du

conjugué, puis du substrat sont identiques à l'ELISA indirect (Figure 3). Cette technique serait quantifiable grâce à une courbe standard unique constituée d'IgG biotinylées. Elle aurait pour avantage une meilleure conservation des Ag sous forme native en évitant les modifications conformationnelles des protéines, suite à leur adsorption sur un support solide et une plus grande souplesse d'utilisation due à l'utilisation de la microplaque commune.

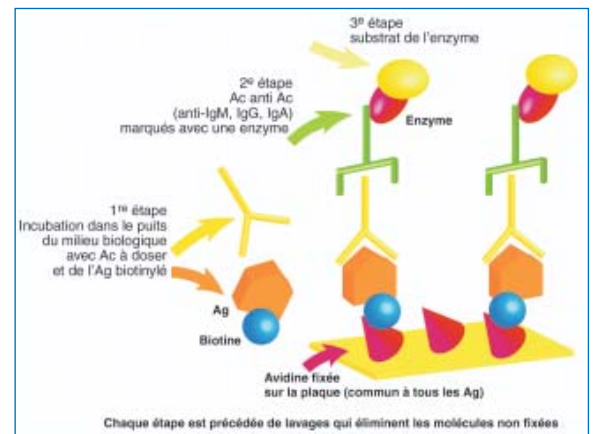


Figure 3 / ELISA indirect avec capture de l'Ag sous forme liquide par le système avidine-biotine.

II/ AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

L'ELISA présente de nombreux avantages. C'est une technique très sensible qui permet la réalisation rapide de grandes séries d'analyses et qui est automatisable. Parallèlement, les automates sont devenus de plus en plus performants et ont pour avantages : une économie de temps de travail, une reproductibilité souvent meilleure qu'en technique manuelle, une gestion informatisée des résultats et des contrôles de qualité...

C'est une technique qui permet de quantifier les Ac avec précision, les résultats peuvent être exprimés en unités internationales s'il existe un sérum de référence ou en unités arbitraires dans le cas contraire. Enfin, on peut préciser l'appartenance des Ac aux différentes classes d'immunoglobulines (en utilisant des conjugués monospécifiques).

Cependant, l'ELISA est influencée par de nombreux facteurs, principalement la nature et la qualité de l'antigène ainsi que l'efficacité de son adsorption sur le support solide. Elle est exposée à de nombreuses causes d'erreur, en particulier des réactions faussement positives.

III/ PROBLÈMES LIÉS À L'ELISA

III.1. NATURE ET QUALITÉ DE L'AG

De nombreux Ag peuvent être utilisés, Ag natif ou dénaturé, d'origine humaine ou animale. L'utilisation de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes peut entraîner une perte de sensibilité du test par rapport à la protéine native. L'ELISA repose sur la reconnaissance d'épitopes conformationnels ; or, une protéine recombinante peut ne pas subir de modifications post-traductionnelles intervenant dans sa structure tridimensionnelle. *A fortiori*, pour un peptide synthétique. Par ailleurs, l'utilisation de peptides synthétiques ou recombinants tronqués ne peut mettre en évidence que les seuls Ac dirigés contre l'épitope porté par ces peptides, et néglige les autres Ac de la réaction polyclonale.

Il est donc fondamental de connaître de façon exacte la nature de l'Ag fixé sur la plaque.

III.2. IMMOBILISATION DES AG

Le choix du support à utiliser pour l'immobilisation des Ag est très important car il conditionne non seulement la quantité de protéines pouvant être adsorbées mais aussi la bonne orientation de la molécule et sa stabilité. Par exemple, pour détecter les Ac anti- β_2 -GPI, on utilise des plaques de polystyrène préalablement irradié ou des plaques de chlorure de polyvinyle [6].

III.3. PROBLÈMES DE FIXATIONS NON SPÉCIFIQUES RESPONSABLES DE FAUX POSITIFS

La fixation non spécifique de protéines plasmatiques sur le support peut être due à une mauvaise saturation des sites libres du

support. Certains constituants, agrégats d'IgG, Ig monoclonales, facteurs rhumatoïdes, peuvent conduire à des résultats faussement positifs.

III.4. PROBLÈMES DE STANDARDISATION

La grande variété des Ag pouvant être fixés sur les plaques ainsi que l'extrême diversité des Ac (affinité, avidité, diversité des épitopes reconnus...) et l'absence dans la plupart des cas de sérum étalon montrent bien la difficulté de standardisation de ces techniques. De nombreuses publications comparant les performances de différentes trousse commerciales ont montré de grandes divergences de résultats [4, 5, 8].

CONCLUSION

Ces techniques sensibles et automatisables se sont fortement développées. Elles restent néanmoins des techniques délicates. Le problème majeur est leur standardisation qui reste difficile en auto-immunité.

Références

- [1] ENGVALL E, PERLMAN P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 1971 ; 8 : 871-4.
- [2] GRÜBER R, FELBER E, PAPE GR, HÖCHTLEN-VOLLMAR W, RIETHMÜLLER G.
Detection of autoantibodies against M2, LKM-1, and SLA in liver diseases by standardized uniform ELISA-techniques.
J Clin Lab Anal 1994 ; 8 : 284-92.
- [3] HUMBEL RL.
Recherche et identification des autoanticorps. In: HUMBEL RL, editor. Autoanticorps et maladies auto-immunes.
Paris : Elsevier ; 1994. p. 27-43.
- [4] REBER G, ARVIEUX J, COMBY E, DEGENNE D, DE MOERLOOSE P, SANMARCO M, *et al.*
Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies.
Thromb Haemost 1995 ; 73 : 444-52.
- [5] TREVISIN M, NEESON P, SAVIGE J.
The binding of proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies (PR3-ANCA) varies in different ELISAs.
J Clin Pathol 2004 ; 57 : 303-8.
- [6] TSUTSUMI A, ICHIKAWA K, MATSUURA E, SAWADA KI, KOIKE T.
Heterogenous behavior of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies on various commercially available enzyme immunoassay plates coated with β_2 -glycoprotein I.
J Rheumatol 2000 ; 27 : 391-6.
- [7] VAN WEEMAN BK, SCHUURS AH.
The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays.
Immunochemistry 1975 ; 12 : 667-70.
- [8] WONG RCW, WILSON RJ, STEELE RH, RADFORD-SMITH G, ADELSTEIN S.
A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits.
J Clin Pathol 2002 ; 55 : 488-94.

L'immunodot

René-Louis HUMBEL, *Laboratoire Luxembourgeois d'Immunopathologie, L-4149 Esch-sur-Alzette, Luxembourg*

La technique de l'immunodot pour la recherche des anticorps a été introduite en 1982 par Paul Herbrinck *et col.* sous l'appellation de « Antigen Spot Test » ou AST [1]. Les auteurs se sont inspirés de la technique du Western blot, ou immunotransfert ou immunoempreinte, développée quelques années auparavant par Towbin [2]. Mais, contrairement à cette dernière, les protéines ne sont pas transférées d'un gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose, mais sont directement appliquées sur des bandelettes sous forme de spots pour former des « dots ». Le terme de dot-blot quelquefois employé est donc tout à fait impropre puisque le procédé ne comporte aucune opération de transfert, c'est-à-dire de « blotting ».

Le dépôt des antigènes peut se faire sous forme d'une petite tache ronde (dot-spot) ou en ligne fine (dot-line). La matrice doit avoir une bonne affinité pour les antigènes et une bonne capacité d'adsorption. La nitrocellulose, hydrophobe, a été utilisée en premier et l'est encore fréquemment pour l'adsorption des protéines. D'autres supports ont été développés à partir de dérivés de la cellulose ou du nylon, pour augmenter la capacité d'adsorption et pour diminuer le bruit de fond lors de la coloration. Le PVDF (polyvinylidène difluorure) est une membrane hydrophile ayant une bonne résistance aux solvants organiques. Ce support est utilisé pour l'immobilisation d'antigènes de nature non protidique, comme les gangliosides, qui sont déposés en solution alcoolique. La capacité d'adsorption sur membrane est nettement supérieure à celle des plaques ELISA. La fixation est rapide, voire instantanée, ce qui réduit le risque de dénaturation des antigènes. Une des préoccupations essentielles est d'adsorber l'antigène en le concentrant au centre du dépôt sans diffusion latérale. Ceci peut être obtenu en utilisant des tampons de forces ioniques adaptées. Plusieurs antigènes différents peuvent être déposés sur la même membrane permettant la détection simultanée de nombreux anticorps différents. Une fois séchée, la membrane est saturée par des agents bloquants et stabilisants puis conservée à l'abri de l'humidité. Ces antigènes alors situés à la surface de la membrane peuvent se complexer avec leurs anticorps spécifiques par incubation

avec le sérum. Les anticorps capturés sont localisés par immunodétection, à l'aide d'un antisérum marqué par une enzyme, et révélés par le substrat correspondant. La lecture des résultats par simple appréciation visuelle de la coloration fournit des résultats qualitatifs, à la limite semi-quantitatifs si l'on tient compte de l'intensité de la coloration. Il existe également la possibilité d'analyser les bandelettes à l'aide d'un scanner qui mesure l'intensité de coloration des spots ou des bandes, permettant une évaluation quantitative.

La plupart des immunodots comportent un spot appelé « cut-off » (valeur seuil). L'intensité de coloration de ce spot est comparée à celle des autres spots et permet d'interpréter les résultats comme positifs ou négatifs. La coloration des spots varie en effet en fonction de la température et de la durée des incubations, d'où l'importance de ce « cut-off », dont la coloration varie parallèlement à celle des spots réactionnels obtenus avec les sérums.

L'immunodot, tout comme les autres méthodes immunologiques voisines, est grandement dépendant de la nature et de la qualité de l'antigène immobilisé sur la membrane. On fait appel à des antigènes natifs, extraits de tissus par des méthodes physico-chimiques ou par immunoaffinité, à des protéines recombinées ou encore des antigènes synthétiques. Le premier dot pour la détection d'autoanticorps a été présenté en 1990 par la firme LipoGen (USA), le RheumaStrip ANA, utilisant des protéines recombinées RNP, Sm, SS-A et SS-B, ainsi que de l'ADN de thymus de veau. Depuis, de nombreux immunodots ont été commercialisés pour la recherche des anticorps antinucléaires et des autoanticorps spécifiques d'organes (*Tableaux 1 et 2*), et ils sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires. Ils prennent tout leur intérêt pour les analyses au coup par coup : soit pour confirmer un aspect de fluorescence (exemple : anticorps anti-mitochondries), soit pour répondre à une demande urgente (exemple : anticorps anti-membrane basale glomérulaire), soit, plus généralement, pour répondre à des demandes de recherches d'autoanticorps trop peu nombreuses pour justifier l'utilisation de techniques comme l'ELISA qui sont mieux adaptées aux analyses en série.

Références

[1] HERBRINK P, VAN BUSSEL FJ, WARNAAR SO.
The antigen spot test (AST) : a highly sensitive assay for the detection of antibodies.
J Immunol Methods 1982 ; 48 : 293-8.

[2] TOWBIN H, STÆHELIN T, GORDON J. USA.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA 1979 ; 76 : 4350-4.

Tableau 1 /
Principaux immunodots actuellement disponibles en France
et en Belgique.

	Fabricants									
	BMD	D-tek	EUROIMMUN	IMTEC	INNOGENETICS	MIKROGEN	ORGENTEC	MILENIA	RAVO	ZENTECH
Ac ANTICYTOPLASMIQUES										
Anti-Jo-1	P	P	P	R	R	R	P			
Anti-PL-7		R								
Anti-PL-12		R								
Anti-ribosomes (P0)	P	P	P		S	R	P			
Anti-SRP				R						
Ac ANTINUCLÉAIRES										
Anti-ADN	P		P	P			R			
Anti-centromère (CENP-B)	R		R	R	R	R	R			
Anti-centromère (CENP-A et CENP-B)		R								
Anti-histones		P	P	P	P	P				
Anti-Ku				R						
Anti-Mi-2				R						
Anti-nucléosomes		P	P	P			P			
Anti-PCNA		R	R			R				
Anti-PM-Scl		R	R	R						
Anti-RNP				P	R	R				
Anti-RNP/Sm		P	P				P			
Anti-Scl-70	P	P	P	R	R	R	P			
Anti-Sm	P	P	P	R	R, S	R	P			
Anti-Sp100				R						
Anti-SS-A	P	R	P	R	P, R	R	R			
Anti-SS-B	P	P	P	R	R	R	P			
Anti-TRIM21 (« SS-A 52 kDa »)			R	R	R		R			
Ac ANTI-POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES										
ANCA-myéloperoxydase (MPO)	P	P	P	P						
ANCA-protéinase 3 (PR3)	P	P	P	P						
Ac ANTI-ESTOMAC										
Anti-cellules pariétales		P					P			
Anti-facteur intrinsèque		P	P				R			
Ac / FOIE										
Anti-F-actine		P								
Anti-LC1 (FTCD)		R	R							
Anti-LKM1 (P450-2D6)	R	R	R	R						
Anti-mitochondries (PDH)	P	P	P	P						
Anti-mitochondries (PDH + OGDC + BCOADC)		P								
Anti-SLA/LP		P	R	R						
Ac / INTESTIN										
Ac anti-gliadine (IgA)		P		P						
Ac anti-gliadine (IgG)		P								
Ac anti-gliadine (IgA ou IgG)							P			
Ac anti-lactoglobuline		P								
Ac anti-Saccharomyces cerevisiae (IgA ou IgG)							P			
Ac anti-soja		P								
Ac anti-transglutaminase tissulaire (IgA)		R	R	R						
Ac anti-transglutaminase tissulaire (IgG)		R								
Ac anti-transglutaminase tissulaire (IgA ou IgG)							R			
Ac ANTI-REIN										
Ac anti-membrane basale glomérulaire	P	R	R							
Ac ANTI-SYSTÈME NERVEUX										
Ac anti-gangliosides			P							P
Anti-glutamate décarboxylase I (GAD 67)		R								
Anti-glutamate décarboxylase II (GAD 65)		R		R						
Anti-neurones : anti-amphiphysine								R	R	
Anti-neurones : anti-CV2 (CRMP5)									R	
Anti-neurones : anti-HuD								R	R	
Anti-neurones : anti-Ma2 (Ta)									R	
Anti-neurones : anti-Ri (Nova-1)								R	R	
Anti-neurones : anti-Yo (CDR62)								R	R	
FACTEURS RHUMATOÏDES										
Anti-IgG animales	P									
Anti-IgG humaines	P									

R = Antigène recombinant ; P = Antigène purifié ; S = Antigène synthétique.

Tableau 2 / Fabricants et distributeurs de dots en France et en Belgique.

FABRICANTS	DISTRIBUTEURS
BMD, Marne-la-Vallée, France	BMD, Bruges, Belgique
D-tek, Mons, Belgique	Alpha-Dia, Wavre, Belgique DiaSorin, Antony, France Ingen, Rungis, France Diamed, Reims, France
EUROIMMUN, Lübeck, Allemagne	BioAdvance, Emerainville, France Biognost, Heule, Belgique
IMTEC, Berlin, Allemagne	ORGENICS France, Courbevoie, France
INNOGENETICS, Gand, Belgique	InGen, Rungis, France
MIKROGEN, Martinsried, Allemagne	ALL.DIAG, Strasbourg, France
ORGENTEC DIAGNOSTIKA, Mainz, Allemagne	Orgentec, Plaisir, France
MILENIA BIOTEC, Bad Nauheim, Allemagne	DPC, La Garenne-Colombes, France DPC, Humbeek, Belgique Ingen, Rungis, France
RAVO, Freiburg, Allemagne	
ZENTECH, Liège, Belgique	Alpha-Dia, Wavre, Belgique InGen, Rungis, France

Principe, avantages et inconvénients de la technique d'immunotransfert dans le cadre de la détection des autoanticorps

Nicole FABIEN, Jean-Claude MONIER, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Unité Fonctionnelle « Auto-immunité », laboratoire d'Immunologie, 69495 Pierre-Bénite Cedex

I/ PRINCIPE

La technique d'immunotransfert nommée Western blot ou immunoblotting (*Figure 1*) comprend trois étapes :

- 1) L'électrophorèse des antigènes en gel.
- 2) Le transfert des antigènes du gel sur un support de nitrocellulose.
- 3) La réaction immunologique : antigène-anticorps.

1. ÉLECTROPHORÈSE DES ANTIGÈNES EN GEL

L'électrophorèse permet de séparer un mélange protéique par la migration de ses constituants sous l'effet d'un champ électrique. Effectuée sur un support en gel de polyacrylamide et en présence de dodécyl sulfate de sodium, elle sépare les protéines en fonction de leur poids moléculaire [1]. Le terme utilisé fréquemment pour désigner cette technique est le SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Le gel de polyacrylamide s'obtient par polymérisation de monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et de son comonomère N, N' méthylène bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Cette polymérisation est initiée chimiquement par le persulfate d'ammonium combiné au N-N'-N'-tétraméthylène-diamine (TEMED).

Une migration sur système multiphasique est utilisée avec l'effet combiné discontinu de tampons de force ionique et de nature d'ions différents qui vont permettre d'obtenir deux gels superposés, l'un de faible concentration en polyacrylamide où commencent à migrer les protéines et où elles se concentrent, et l'autre de forte concentration où elles vont se séparer. L'objectif de l'association de ces deux gels est d'éviter les problèmes liés aux faibles quantités de protéines et aux volumes parfois non négligeables déposés dans les puits. Le taux de réticulation, qui correspond à la porosité du gel, dépend du poids d'acrylamide et de bisacrylamide contenu dans 100 ml. La concentration du premier gel est de 4 %, et celle du gel de séparation entre 5 et 20 % suivant la taille des protéines que l'on veut séparer.

Poids moléculaire (kDa)	Pourcentage d'acrylamide
10 - 40	15 - 20
40 - 100	10 - 15
100 - 300	5 - 10
300 - 500	5
> 500	2 - 5

Le but de l'électrophorèse est d'obtenir une séparation des protéines selon leur poids moléculaire (PM). L'encombrement stérique à l'origine de l'effet filtrant est fonction du PM et de la forme de la molécule. Par l'intermédiaire d'un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), les effets de la charge et de la forme de la protéine sont supprimés. En effet, par sa très forte affinité pour les protéines auxquelles il se lie par liaisons hydrophobes, le SDS va conférer une charge électrique constante, largement supérieure à la charge intrinsèque de la protéine. C'est ainsi que chaque protéine acquiert une densité de charge identique, ce qui permet de les séparer en fonction de leurs tailles (donc de la masse molaire) et non pas en fonction de leurs charges. De plus, par son effet détergent, le SDS déroule les protéines et les met sous forme de bâtonnets, inhibant l'effet de leur configuration spatiale. La dénaturation par le SDS est complétée par le chauffage à 100 °C de la solution où se trouve l'échantillon. Outre le SDS, cette solution comporte du 2-mercaptoéthanol (ME) et du glycérol. Grâce à son pouvoir réducteur, le ME dissocie les ponts disulfures. Le glycérol confère à la solution d'échantillon une forte densité lui permettant de ne pas se diluer dans le tampon lors du dépôt. De la pyronine est rajoutée dans le tampon de l'échantillon comme marqueur de la migration : elle n'est pas retenue par le gel et indique donc le front de migration électrophorétique. Quand le colorant atteint le bas du gel, l'électrophorèse est arrêtée.

Les protéines présentent une migration électrophorétique inversement proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire. Les petites protéines vont vite car elles passent facilement dans les pores du gel, alors que les grosses protéines sont retardées par friction avec le polymère. Le logarithme du PM est proportionnel à la mobilité relative, c'est-à-dire au rapport entre la distance de la migration de la protéine et celle du marqueur du front de migration, la pyronine. Le « Rf » représente ainsi le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration. À l'aide de protéines « standards », une courbe d'étalonnage est établie.

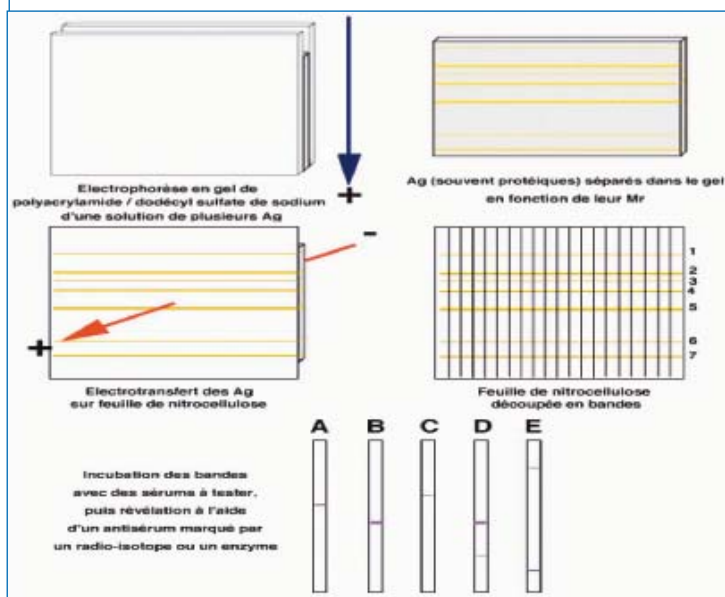


Figure 1 / Immunotransfert.

Les protéines ou antigènes utilisés correspondent à des extraits bruts ou semi-purifiés d'organes, de cellules ou d'organites cellulaires ou à des antigènes recombinants.

2. LE TRANSFERT DES ANTIGÈNES DU GEL SUR DE LA NITROCELLULOSE

Les différentes protéines contenues dans le gel seront adsorbées sur un support immobilisant qui doit avoir une bonne affinité pour la protéine et une forte capacité d'adsorption. Il s'agit le plus souvent d'une membrane de nitrocellulose, mais d'autres supports sont parfois utilisés, comme le nylon ou le fluorure de polyvinylidène (PVDF). L'empreinte se dit blot en anglais d'où le nom de Western blot, par référence à la technique initiale du Southern blot pour l'ADN (technique inventée par E. Southern). La technique du transfert électrophorétique des protéines a été introduite pour la première fois par Towbin [2]. Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées par l'intermédiaire d'un courant électrique sur une membrane par un système semi-sec ou sec. Les protéines se fixent par liaisons hydrophobes et électrostatiques sur la membrane de nitrocellulose où elles peuvent être facilement reconnues par des anticorps.

Le principe du transfert est le même que l'électrophorèse de zone monophasique. Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS et donc, sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de l'anode vers la cathode. Le méthanol (contenu dans la solution de transfert) « active » le gel en enlevant le SDS des protéines et en augmentant la liaison des protéines à la membrane, mais il peut diminuer le transfert de certaines protéines. Il y a deux facteurs critiques durant le transfert : d'une part, l'efficacité d'éluion des protéines hors du gel, qui est déterminée par la concentration en acrylamide du gel, la force ionique, le pH du tampon et la composition du tampon de transfert, d'autre part, la capacité de la matrice à lier les protéines, qui est principalement déterminée par la nature de la membrane mais aussi par la composition du tampon de transfert. Le méthanol favorise l'adsorption sur la membrane chargée négativement. Il permet aussi d'augmenter la capacité de liaison de la matrice par exposition des domaines hydrophobes des protéines, mais il réduit l'efficacité de l'éluion en diminuant la taille des pores.

Après le transfert, il est possible de colorer la membrane avec un colorant spécifique des protéines, comme par exemple le rouge de ponceau pour valider cette étape de transfert. Puis tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane doivent être bloqués ou saturés pour assurer une bonne spécificité (diminution du bruit de fond). Cette étape est effectuée avec un détergent non ionique, le Tween-20, et comme protéine, de la BSA (bovine serum albumin) ou du lait écrémé en poudre, délipidé. Le Tween 20 minimise l'adsorption non spécifique protéine-protéine et protéine-matrice en empêchant les interactions non-covalentes et hydrophobes et affecte peu les interactions antigènes-anticorps.

3. LA RÉACTION IMMUNOLOGIQUE : ANTIGÈNE-ANTICORPS

La technique d'immunotransfert permet la mise en évidence de différents autoanticorps présents dans le sérum de patients avec une identification précise des PM des antigènes cibles.

Une première étape consiste à mettre en contact le sérum et la membrane de nitrocellulose sur laquelle ont été transférés les antigènes. La dilution des sérums s'effectue le plus souvent dans un tampon Tween 20-lait délipidé et elle varie de 1/100 au 1/500 selon les autoanticorps recherchés. Une forte dilution est parfois nécessaire pour certains autoanticorps ; en effet, des quantités excessives d'immunoglobulines tendent à augmenter le bruit de fond plus que la sensibilité de la technique ; ainsi les liaisons non spécifiques peuvent souvent être réduites avec une dilution du sérum plus élevée.

La seconde étape consiste à éliminer les immunoglobulines du sérum non fixées sur la membrane de nitrocellulose, grâce à des lavages par le PBS-Tween.

La troisième étape consiste à détecter les anticorps fixés et ce, grâce à des anticorps anti-immunoglobulines humaines généralement conjugués à la peroxydase (HorseRadish Peroxydase : HRP) ou à la phosphatase alcaline ou à l'or colloïdal. Après lavages en PBS-Tween, l'activité enzymatique de la HRP est mise en évidence par l'addition de son substrat : le chloronaphthol. La réaction est arrêtée par lavage à l'eau distillée. Les bandelettes de nitrocellulose sont ensuite séchées et conservées à l'abri de la lumière à température ambiante. Le conjugué peut être remplacé par un ligand spécifique de certaines immunoglobulines, par exemple la protéine A marquée provenant du staphylocoque doré et qui a une grande affinité pour les IgG humaines.

Une lecture qualitative ou semi-quantitative (densitomètre) de l'intensité des colorations peut ensuite être réalisée.

Des procédés d'amplification comme la méthode de chimiluminescence peuvent améliorer la sensibilité de la technique. On emploie comme traceur un substrat qui, au contact de l'enzyme, est transformé en un produit insoluble : il précipite sur place et devient chimiluminescent. La matrice est alors mise en contact avec un film très sensible qui sera impressionné par les photons provenant du traceur ayant précipité à l'endroit où se trouvait l'antigène.

Les traceurs radioactifs sont employés particulièrement quand une grande sensibilité est requise. La détection peut alors se faire par autoradiographie ou fluorographie.

4. VARIANTES

- Les gels à concentration déterminée peuvent être remplacés par un seul gel mais avec un gradient de concentration. L'avantage est de séparer de façon convenable sur le même gel les peptides et protéines de 4 à 400 kDa.
- Des immunotransferts peuvent aussi être réalisés avec des électrophorèses en double dimension : électrofocalisation (IEF : IsoElectric Focusing) en première dimension et SDS-PAGE en seconde dimension.

Dans l'IEF, la migration est effectuée dans un gradient de pH ; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. Un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose) est utilisé, pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou ± étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution qui génère un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel. Il existe de telles molécules de petit poids moléculaire et solubles (ampholines) et il existe également des gels à base d'acrylamide modifiée contenant des groupements acides et basiques fixés (gels d'immobilines).

Les immunotransferts en double dimension sont réservés à la recherche.

- Rarement, des immunotransferts sont réalisés en utilisant seulement une IEF pour séparer les protéines ; dans ce cas, on fait sortir les protéines du gel par simple diffusion par contact avec la membrane.
- Enfin, les protéines antigènes sont parfois immobilisées en déposant directement une solution de l'Ag sur la matrice. C'est le principe de l'adsorption ponctuelle (« dot blot » ou « slot-blot ») qui ressemble au transfert Western. Les protéines y sont donc immobilisées par application directe sous forme de petites taches. Après leur immobilisation, elles peuvent être soumises au même genre de traitement qu'un Western blot. Dans ce cas,

les antigènes ne sont pas dénaturés et, en général, il s'agit de protéines purifiées ou recombinantes.

II/ AVANTAGES

La technique d'immunotransfert permet de détecter des autoanticorps non détectés par les techniques immunoenzymatiques de type ELISA.

Elle permet d'identifier avec précision le PM et, donc, la nature de l'antigène cible reconnu par les autoanticorps.

Elle permet de réaliser une identification de plusieurs antigènes présents dans un échantillon contenant plusieurs protéines (exemples des protéines ribosomiques, mitochondriales, des histones et des protéines du réticulum endoplasmique).

III/ INCONVÉNIENTS

Les protéines sont dénaturées par le SDS et, ainsi, seuls les épitopes « linéaires » persistent ; la technique ne permet pas de détecter des autoanticorps dirigés contre des épitopes conformationnels. Différents procédés de renaturation des protéines sur la membrane ont été proposés comme celui de Durin, mais aucune preuve sérieuse de renaturation des protéines n'a été apportée.

Le méthanol utilisé dans le transfert des protéines du gel sur la nitrocellulose peut diminuer le transfert de certaines protéines en réduisant l'affinité du SDS pour ces protéines, qui seront ainsi en quantité insuffisante pour être reconnues par les anticorps.

L'interprétation peut être difficile lorsque les préparations antigéniques sont contaminées par d'autres protéines comme dans le cas des protéines non histoniques dans les préparations d'histones.

Un sérum témoin connu positif doit être utilisé dans chaque réaction. En effet, le PM attendu dit « apparent » peut varier de 5 à 8 % par rapport au PM théorique.

Cette technique est d'une durée beaucoup longue par rapport aux techniques immunoenzymatiques de type ELISA.

IV/ APPLICATIONS PRATIQUES EN AUTO-IMMUNITÉ

La technique d'immunotransfert est utilisée pour caractériser les antigènes cibles en pratique courante, mais le plus souvent en seconde intention lorsque ces antigènes n'ont pas été identifiés par un test immunoenzymatique de type ELISA utilisé en première intention. Ainsi, peuvent être recherchés les autoanticorps anti-protéines ribosomiques, anti-histones, anti-mitochondries, anti-réticulum endoplasmique, anti-filagrine et anti-récepteur sensible du calcium (ELISA non disponible pour ces derniers autoanticorps).

1. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-MITOCHONDRIES (Figure 2)

L'immunotransfert utilise des antigènes extraits de cœur de porc riche en mitochondries ; des antigènes d'autres origines, notamment du muscle humain, peuvent également être utilisés.

L'antigène M2 est un système antigénique complexe comportant plusieurs peptides. Les trois 2-oxo déshydrogénases acides représentent les cibles majeures des autoanticorps anti-mitochondries. Ces complexes sont la Pyruvate DeHydrogenase (PDH) principalement de 78 kDa, la 2-Oxo GlutarateDeHydrogenase (OGDH) de 48 kDa et la Branched Chain 2-Oxo Acid DeHydrogenase (BCO-ADH) de 52 kDa. Le complexe PDH est constitué par 60 copies de dihydrolipoamide acetyltransferase (sous-unité E2) associées à deux décarboxylases (sous-unités E1α et E1β) et à la dihydrolipoa-

mide dehydrogenase (sous-unité E3). La PDH-E2 comprend 2 auto-épitoques dont l'un est commun avec la protéine X (E3 Binding Protein : E3BP) de 54 kDa. Le complexe OGDH comporte 24 copies de E2 acétyltransférase entourées de E1 α et E1 β décarboxylases et de E3. La structure est analogue pour la BCOADH. La sous-unité E3 est la même pour PDH, OGDH et BCOADH.

La fréquence des autoanticorps contre les sous-unités E2 au cours des cirrhoses biliaires primitives (CBP) se fait comme suit : PDH-E2 : 90-95 %, BCOADH-E2 : 30 à 45 % et OGDH-E2 : 20 %.

Dans 5 à 10 % des CBP positives en immunofluorescence sur triple substrat mais négatives en autoanticorps anti-PDH-E2 par ELISA ou dot, d'autres constituants de la mitochondrie, cibles de ces autoanticorps, peuvent être ainsi identifiés par la technique d'immunotransfert. Il s'agit principalement de BCOADH-E2 (52 kDa), OGDH-E2 (48 kDa), PDH-E1 α (41-43 kDa) et/ou PDH-E1 β (32-33 kDa) et E3 (53 kDa). Il existe également des cas où l'immunofluorescence sur triple substrat est négative avec une réaction positive en immunotransfert. Ces cas sont souvent observés dans des affections hépatiques autres que la CBP ; l'antigène est principalement la BCOADH-E2 et la cause de la maladie est souvent une infection par le virus C ; des autoanticorps anti-E3 de 53 kDa ont aussi été décrits chez 53 % des patients atteints d'hépatite C. L'antigène X peut également être la cible d'autoanticorps dans la cirrhose alcoolique. Enfin, dans de rares cas, certaines CBP n'ont que des anticorps anti-PDH d'origine humaine.

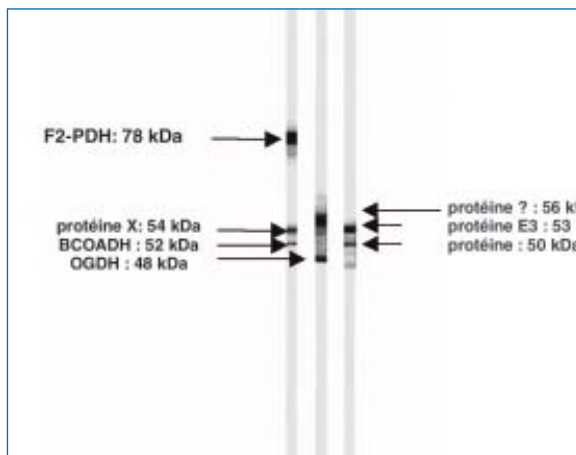


Figure 2 / Autoanticorps anti-mitochondries. Immunotransferts réalisés avec des mitochondries de cœur de porc. Sérums avec différentes réactivités présentant différents autoanticorps anti-mitochondries.

2. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE (ANTI-LIVER & KIDNEY MICROSOMES OU ANTI-LKM) (Figure 3)

L'immunotransfert utilise des antigènes extraits de foie de rat riche en réticulum endoplasmique. L'antigène majeur des autoanticorps anti-LKM est le cytochrome CYP2D6 de 50 kDa (LKM1). Les anticorps sont surtout retrouvés au cours des hépatites de type II, mais également dans les hépatites C : dans ce cas, ils reconnaissent des épitoques différents de ceux de l'hépatite de type II. Dans les hépatites chroniques actives de type II du jeune, avec autoanticorps anti-LKM1 mis en évidence par IFI, les autoanticorps anti-CYP2D6 ne sont présents que dans 60 à 70 % des cas.

D'autres polypeptides peuvent être la cible des autoanticorps anti-LKM1, par exemple les protéines de 62 à 66 kDa. Ces autoanticorps anti-p62/66 peuvent coexister avec les autoanticorps anti-cytochrome (20 % des cas environ) ou peuvent être présents en l'absence de ces autoanticorps (30 % des cas environ). Trois autres cibles moléculaires (58, 40 et 35 kDa) des autoanticorps anti-LKM1 ont été décrites. Dans ces cas, l'immunotransfert permet de révéler l'ensemble de ces anticorps en comparaison de l'ELISA qui utilise un antigène unique « le cytochrome P450 IID6 ».

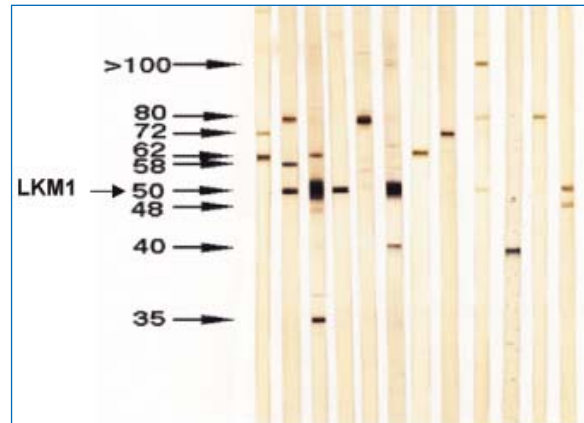


Figure 3 / Autoanticorps anti-réticulum endoplasmique. Immunotransferts réalisés avec des sérums donnant en immunofluorescence indirecte un aspect d'Ac anti-LKM1. La cible moléculaire la plus fréquemment reconnue est le cytochrome CYP2D6 de 50 kDa.

3. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-HISTONES (Figure 4)

L'immunotransfert utilise des préparations d'histones extraits de thymus de veau et permet d'identifier le type d'histones reconnu par les autoanticorps : H1, H3, H2a, H2b, H4 présentant un PM de respectivement 23, 15, 14, 14 et 11 kDa par comparaison à la technique immunoenzymatique de type ELISA qui ne permet pas l'identification du type d'histones.

Les autoanticorps anti- H1, H2a, H2b sont surtout présents dans le lupus érythémateux disséminé (LED) et les autoanticorps anti-H3, H4 plutôt dans le lupus iatrogène.

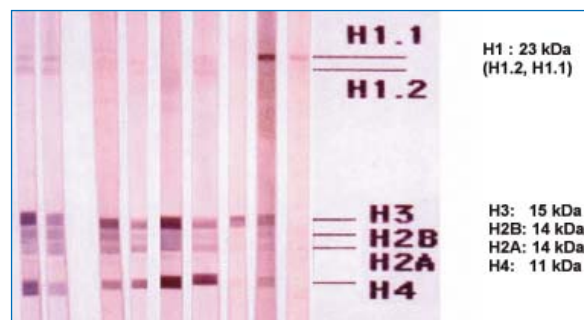


Figure 4 / Autoanticorps anti-histones. Immunotransfert utilisant des préparations d'histones extraits de thymus de veau. Sérums avec différentes réactivités présentant différents autoanticorps anti-H1, H3, H2a, H2b, H4.

4. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-PROTÉINES RIBOSOMIQUES (Figure 5)

L'immunotransfert utilise des antigènes extraits de foie de rat, enrichis en protéines de 60S. Il permet d'identifier trois phosphoprotéines P0 (38 kDa), P1 (19 kDa) et P2 (17 kDa) de la sous-unité 60S. Les sérums de LED (12 % des LED d'adultes et 42 % des LED juvéniles) contiennent des autoanticorps se fixant sur ces protéines. Selon certains auteurs, ils seraient également présents dans les manifestations neuropsychiatriques du LED, mais cette association n'a pas été retrouvée par d'autres auteurs.

Ces autoanticorps sont majoritairement dirigés contre l'extrémité C-terminale commune aux 3 phosphoprotéines (11AA), mais des épitoques situés notamment du côté N-terminal, spécifiques de P1 ou P2, sont aussi les cibles des autoanticorps anti-P.

Ainsi, le test en immunotransfert est plus sensible que la technique ELISA car cette dernière utilise le plus souvent des peptides correspondant à la partie C-terminale commune des trois pro-

téines, alors que 50 % des sérums positifs ne réagissent pas avec les épitopes communs aux trois protéines.

La technique d'immunotransfert permet également de détecter des autoanticorps dirigés contre d'autres protéines ribosomiques telles que des protéines de 31 kDa spécifiques du lupus par comparaison à la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou à d'autres maladies auto-immunes, et des autoanticorps anti-protéine L7 (28 kDa) présents dans 34 à 71 % des LED, 57 % des greffés du cœur développant une coronarite, 54 % des connectivites mixtes, 38 % des sclérodermiques, 28 % des PR et 25 % des syndromes de Gougerot-Sjögren.

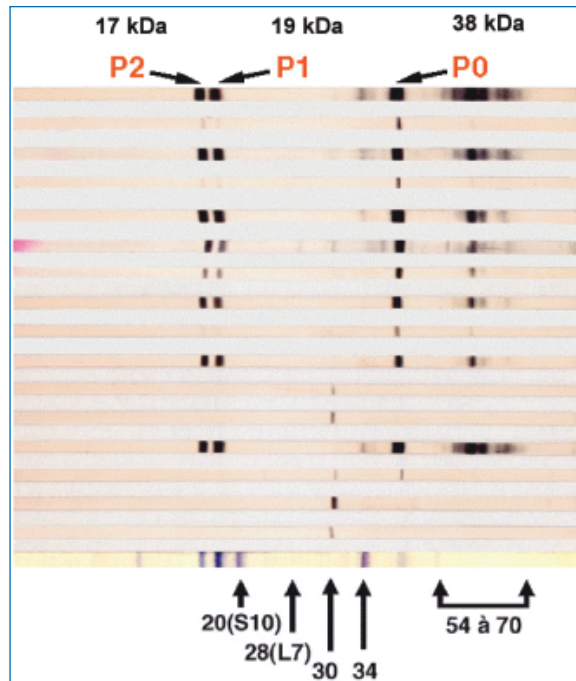


Figure 5/ Autoanticorps anti-protéines ribosomiques 80/60S.

5. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-FILAGRINE (Figure 6)

L'immunotransfert utilise un extrait d'épiderme humain ou, mieux, des extraits de filagrine enrichie ou purifiée surtout obtenus à partir d'épiderme humain par différentes techniques. Les autoanticorps anti-filagrine se fixent au niveau d'une bande diffuse qui s'étend de 37 à 40 kDa, mais parfois aussi au niveau de molécules de plus de 40 jusqu'à 400 kDa correspondant probablement aux formes de transition de la profilagrine à la filagrine.

Cette méthode permet de confirmer la spécificité « anti-filagrine » des autoanticorps antistratum corneum détectés en IFI. Les autoanticorps détectés sont dirigés contre des épitopes séquentiels, alors que la technique d'IFI permet en plus de révéler des anticorps dirigés contre les épitopes conformationnels. Elle peut être utile également dans les rares cas d'ELISA négatifs utilisant des mélanges de peptides de synthèse citrullinés (anti-CCP) apparentés à la filagrine et correspondant surtout à la région C-terminale de la protéine.

6. DÉTECTION DES AUTOANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR SENSIBLE DU CALCIUM (Figure 7)

L'immunotransfert utilise un antigène recombinant correspondant au domaine extracellulaire du récepteur sensible du calcium.

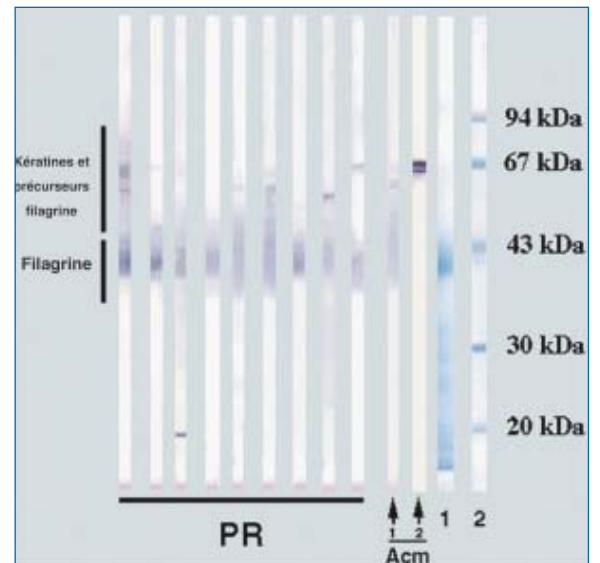


Figure 6 / Autoanticorps anti-filagrine.
Acm 1 : Ac monoclonal anti-filagrine AKH1.
Acm 2 : Ac monoclonal anti-kératine KLI.
Bande 1 : Protéines de l'extrait d'épiderme humain enrichi en filagrine.
Bande 2 : Standard de PM.
Bandes PR : Sérums de PR avec Ac anti-filagrine.

L'antigène reconnu a un PM de 70 kDa. Ces autoanticorps sont décrits dans 30 % des hypoparathyroïdies acquises isolées et dans certaines hypoparathyroïdies qui se manifestent chez 80 % des patients atteints de polyendocrinopathie de type I, pour la plupart des enfants et adolescents et, plus rarement, chez les patients adultes atteints de polyendocrinopathie de type II. La technique d'immunotransfert est plus sensible que la technique radio-immunologique.

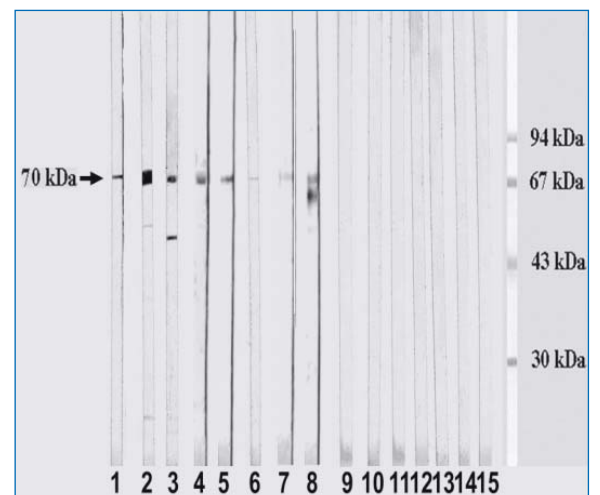


Figure 7/ Autoanticorps anti-récepteur sensible du calcium. Antigène humain recombinant du domaine extracellulaire du récepteur sensible du calcium. La réactivité est observée au niveau du poids moléculaire de 70 kDa ; Ac monoclonal anti-CaSR (ligne 1), sérums positifs de patients avec hypoparathyroïdie (lignes 2 à 8), sérums négatifs de patients avec hypoparathyroïdie (lignes 9 à 11), sérums négatifs de patients avec PEA type II (lignes 12 à 16). Marqueurs de poids moléculaire (ligne à droite).

CONCLUSION

La technique d'immunotransfert est particulièrement intéressante pour la recherche, notamment dans sa variante en double dimension. Elle a permis de mettre en évidence de nouveaux autoanticorps dont l'antigène cible n'était pas encore identifié. En pratique courante, cette technique est utilisée en seconde intention pour identifier des autoanticorps non caractérisés par des techniques plus faciles à mettre en œuvre, comme les techniques immunoenzymatiques de type ELISA.

Références

[1] LAEMMLI, UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 1970 ; 227 : 680-5.

[2] TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J USA.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc Natl Acad Sci USA 1979 ; 76 : 4350-4.

Biopuces à autoantigènes pour la caractérisation des autoanticorps dans les maladies auto-immunes

Chantal ANDRÉ, Service d'Immunologie biologique, CHU Henri-Mondor, 94010 Créteil
E-mail : chantal.andre@hmn.ap-hop-paris.fr

I/ INTRODUCTION

De nouvelles technologies permettant d'étudier globalement le génome, le transcriptome et le protéome se sont largement développées dans les dix dernières années. Appliquées aux maladies auto-immunes, elles permettent une classification moléculaire des pathologies, autant pour l'aide au diagnostic, l'identification de nouvelles entités et l'étude de la physiopathologie [3] que pour la caractérisation de nouvelles cibles pour la thérapeutique [17]. La protéomique, l'étude à grande échelle de l'expression, des fonctions et de l'interaction des protéines exprimées dans un tissu ou organisme, s'est ainsi plus récemment développée. Des avancées importantes ont été faites au cours des trois dernières années dans le développement de méthodes permettant d'analyser plusieurs protéines ou autres biomolécules en même temps [9]. La technologie des biopuces (microarrays ou micro-réseaux) dérivée des technologies des puces à ADN, puis à ARN, s'est élargie à l'étude des protéines (puces à protéines) et même aux puces à cellules ou tissus. Plusieurs groupes ont développé des méthodes dérivées des puces à ADN en utilisant les appareils robotisés destinés aux dépôts précis des cDNA pour générer des « réseaux organisés de protéines », dépôts de nombreuses protéines différentes en vue d'étudier leurs interactions avec d'autres protéines, enzymes ou médicaments [12] et les systèmes antigène-anticorps [6].

L'étude des autoanticorps par la technique des biopuces fait ainsi partie des méthodes de caractérisation en « multiplex » des autoanticorps. Les premiers travaux rapportant cette technique pour l'analyse de nombreux autoanticorps dans les maladies auto-immunes ont été publiés en 2002 [14]. Mais si les technologies basées sur les puces (notamment à ADN) donnent lieu à de très nombreuses publications, les progrès semblent lents sur les puces à protéines étant donné la rareté des études rapportées, notamment pour la détection des autoanticorps.

II/ MÉTHODOLOGIE

II.1. TECHNIQUE

Différents systèmes de puces à protéines existent. La technique de base, utilisée pour l'identification des autoanticorps à partir de puces à autoantigènes décrite par l'équipe de Robinson [14, 15] qui a modifié le protocole expérimental introduit par Haab et coll. [6], est basée sur la technologie des puces à ADN. Elle permet le dépôt de très nombreux antigènes en microquantité sur une surface plane. Elle nécessite l'utilisation d'un robot diluteur qui prépare les solutions d'antigènes, d'un micropipetteur robotisé qui dépose les antigènes sur la surface de la puce, de marqueurs fluorescents, d'un scanner analyseur d'images en fluorescence et d'un logiciel d'interprétation.

D'autres protocoles, sur un nombre plus limité d'antigènes, ont aussi été décrits [5, 7].

La technique peut se diviser en 3 temps :

► *Préparation des biopuces*

Les antigènes pré-dilués sont transférés par un robot dans des microplaques de 384 puits. Un robot micropipetteur est utilisé pour déposer les antigènes sur des lames de microscope dans un ordre précis. Des centaines de protéines, peptides ou autres biomolécules (acides nucléiques) peuvent être ainsi attachées à la surface de la lame. Les lames ainsi préparées peuvent être conservées à 4 °C et gardent leur réactivité pendant des mois [14]. Différents types de support ont été testés : lames de verre ou polystyrène pré-traitées selon divers procédés ou des membranes [7].

► *Marquage des puces*

Les lames sont incubées avec les sérums (dilués) à étudier. Après lavages, les lames sont incubées avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugués avec les fluorophores vert Cy-3 (indocarbocyanine) ou rouge Cy-5 (indodicarbocyanine) [14]. Après lavage, les puces sont séchées rapidement.

Hiepe *et al.* [7] ont développé un système sur membrane utilisant des antiglobulines marquées par la peroxydase de Raifort (HRP) et révélation par le substrat tétraméthylbenzidine (TMB), tandis qu'une autre équipe [5] a utilisé un support de polystyrène, des anti-globulines marquées à l'HRP et un système de révélation en chemiluminescence.

► *Lecture*

Les lames marquées par les fluorochromes sont analysées en utilisant un scanner numérique basé sur la fluorescence (laser) (exemple : GenePix 4000 Scanner) et un logiciel approprié (exemple : logiciel GenePix Pro 3.0, [10]).

Une description de la technologie utilisée par l'équipe de Stanford et des informations sur la construction des robots, sur les protocoles, logiciels et outils statistiques peuvent être trouvées sur différents sites de la Stanford (USA) University School of Medicine dont <http://www.stanford.edu/group/antigenarrays>.

Le système de révélation présenté par Hiepe [7] ne nécessite qu'un scanner optique conventionnel.

II.2. AVANTAGES

Les avantages retenus à partir des travaux de Robinson [14] sont multiples :

- La recherche des autoanticorps par miniaturisation permet l'étude d'un large profil d'anticorps : 196 molécules différentes ont été étudiées, et plus dans d'autres études en cours ;
- La quantité d'antigènes nécessaire est très faible : 1 nl de solution contenant 200 pg d'antigène (protéines, peptides, ADN, enzymes, complexes ribonucléoprotéiques). Le dépôt de l'antigène se faisant sur une aire de 150 microns de diamètre, 15 000 caractères pourraient être ainsi déposés sur une surface de 1,8 cm x 5,4 cm ;
- La quantité de sérum nécessaire est très faible : 2 microlitres en utilisant un protocole standard normal de dépôt sur lame, seulement 0,15 microlitre lorsqu'on emploie une lamelle. Il est possible d'utiliser d'autres fluides, tels que le liquide céphalo-rachidien, le liquide synovial ou des éluats de tissus ;
- Les anticorps sont détectés au nanog/ml. La technique serait 4 à 8 fois plus sensible que l'ELISA pour la détection des autoanticorps dirigés contre 5 autoantigènes recombinants ;
- La technique de dépistage est rapide et permet aussi de différencier les isotypes ou sous-classes d'anticorps. Si actuellement 2 isotypes peuvent être détectés simultanément, de nouveaux scanners permettant d'examiner en même temps 4 couleurs de fluorescence ou plus permettraient l'analyse de plus de 2 isotypes [18] ;
- Cette technologie serait peu coûteuse du fait de l'utilisation de très infimes quantités d'antigènes.

II.3. LIMITES ET INCONVÉNIENTS DE LA TECHNIQUE

Divers problèmes se sont révélés qui n'existent pas pour les puces à ADN, notamment en ce qui concerne l'immobilisation des antigènes et les stratégies de détection.

Les autoantigènes ont des structures moléculaires de natures différentes : ainsi les protéines, peptides, ADN, phospholipides, lipoprotéines, glycoprotéines ou organelles complètes n'ont pas toutes et tous les mêmes propriétés de fixation sur un support, alors que l'ADN chargé négativement se fixe sur le support d'une façon bien définie. Les protéines peuvent être hydrophobes, hydrophiles, acides, basiques, glycosylées, et sont notamment sensibles à la dénaturation [4, 11]. Différents supports ont été testés, lames de verre ou polystyrène, traitées ou non, ou des membranes de nitrocellulose, nylon, polyfluorure de vinylidène (PVDF) [5, 7, 14], avec des résultats variables. Robinson [14] signale que les anticorps dirigés contre certains antigènes ne sont pas détectables (protéines Sm, histones) dans leur protocole, ceci pouvant être expliqué par l'absence de structures tridimensionnelles, des interférences stériques ou des répulsions électrostatiques.

Les sérums des patients peuvent donner un bruit de fond élevé variable selon les supports ou les systèmes de révélation.

Des conditions d'incubation (tampons, etc.) compatibles avec tous les types d'antigènes doivent être trouvées.

La corrélation entre le signal mesuré sur la puce et la concentration en anticorps est imparfaite, les affinités variables des autoanticorps étant probablement en cause.

III/ RÉSULTATS ET APPLICATIONS ACTUELLES

Peu de travaux ont été publiés jusqu'à présent et essentiellement par les équipes de la Stanford University School of Medicine. Elles sont en train de développer des puces représentant le « protéome » de cibles tissulaires de différentes maladies auto-immunes.

III.1. PUCES POUR L'ÉTUDE DES CONNECTIVITES

Le travail le plus détaillé et validé concerne la détection sensible et spécifique d'autoanticorps dans les connectivites, essentiellement le lupus érythémateux systémique, la sclérodermie, le syndrome de Gougerot-Sjögren et les connectivites mixtes. Le système est basé sur celui des puces à ADN [14]. Des spots en 4 ou 8 copies de 196 biomolécules différentes dans une puce de 1 152 caractères ont été préparés. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par les techniques ELISA, d'immuno-précipitation ou d'analyse en Western blot. Parmi les antigènes déposés, les protéines recombinantes ou purifiées suivantes ont été utilisées : « Ro52 », La, Jo-1, H2A, Sm-B/B', U1 70 kD, U1snRNP-C, complexe Sm/RNP, DNA topo-isomérase I, protéine CENP-B, pyruvate déshydrogénase (PDH), divers dsDNA et ssDNA, différents peptides de protéines Sm, protéines snRNP, histones H1, H2A, H3 et H4. Des anticorps spécifiques des IgG et les IgM humaines, des vaccins (antigènes du virus de la grippe et du pneumocoque) ont été fixés sur la puce pour servir de contrôles. Les anticorps secondaires étaient marqués à Cy-3. Les essais effectués avec 50 sérums de pathologies diverses ont montré des résultats comparables aux autres techniques pour beaucoup d'antigènes. Les 10 sujets sains contrôlés étaient négatifs pour tous les anticorps sauf pour la détection des anticorps contre les antigènes de pneumocoques et de la grippe. Il a aussi été montré que ce test permet de faire une cartographie de la réponse anticorps, par exemple sur des épitopes d'histones, et d'étudier les sous-classes IgG1, 2 et 3 en utilisant des anticorps monoclonaux conjugués à Cy-5 dirigés contre les 3 sous-classes.

III.2. PUCES À ANTIGÈNES DANS D'AUTRES PATHOLOGIES

Des biopuces ont été construites et sont en cours de validation pour certaines maladies dont la polyarthrite rhumatoïde, le diabète insulino-dépendant [8, 15], la cirrhose biliaire primitive, la maladie de Wegener, la cholangite sclérosante primitive [18]. Des puces à protéome de myéline sont en cours d'étude pour le profil de la réponse anticorps dans la SEP et dans le modèle expérimental de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et des essais de vaccination chez la souris [8, 15, 16].

III.3. DÉVELOPPEMENT INDUSTRIEL

Aucune étude en série suite à un développement industriel ne semble avoir été publiée à ce jour. Mais cette technologie intéresse les firmes qui vont proposer probablement dans l'avenir des puces prêtes à l'emploi et ne nécessitant pas de scanner laser [7].

IV/ APPLICATIONS POTENTIELLES

- La première application est d'obtenir un dépistage rapide en multiplex des spécificités anticorps connues associées aux maladies auto-immunes pour permettre un diagnostic précoce.
- La possibilité de déterminer les isotypes et sous-classes des anticorps est un argument pour étudier leur potentiel pathogène (IgG1 et IgG3, anticorps fixant le complément).
- Ce type de technologie peut constituer un outil judicieux pour identifier rapidement de nouveaux autoantigènes et épitopes en utilisant des banques d'expression de cDNA, des banques de peptides ou des fractions de tissus cibles, et ainsi de nouveaux autoanticorps d'intérêt diagnostique.
- La caractérisation à grande échelle de l'évolution de la réponse immune humorale, c'est-à-dire l'étude de la diversification épitopique inter- et intra-moléculaire chez l'animal et dans les maladies humaines, pourrait être obtenue.
- Par la découverte de nouveaux autoantigènes, des thérapies spécifiques d'antigènes (administration d'agents thérapeutiques spécifiques, ou induction d'une tolérance, en particulier par des vaccins ADN) [16, 17] pourraient se développer.

CONCLUSION

Les tests récemment publiés basés sur des biopuces composées d'antigènes répartis sous forme de multiples spots sur des surfaces planes semblent offrir des protocoles simples et prometteurs pour la détection de nombreux anticorps dans un sérum et ainsi définir un « profil » d'autoanticorps. Mais il faudra du temps avant que cette technologie ne puisse être appliquée à une utilisation courante pour le dépistage clinique.

V/ LIMITES ET PERSPECTIVES

La validation de cette nouvelle technologie des puces à antigènes est nécessaire : une étude extensive doit être entreprise sur des milliers de sérums déjà caractérisés par les méthodes standards pour montrer la valeur et la reproductibilité des résultats, leur sensibilité et spécificité, avant de l'utiliser dans une pratique clinique de routine.

Ceci ne pourra être effectué qu'après avoir résolu et optimisé les différents problèmes techniques qui se posent : la production et la purification des antigènes, les conditions de dépôts et les supports plans pour éviter l'altération des épitopes, la détection de la fluorescence ou d'un autre système de révélation (scanner laser ou optique) et la quantification des concentrations d'anticorps.

Dans *Médecine Science*, B JORDAN [10] résume bien les difficultés posées par les puces à protéines : « 1- disposer de nombreuses protéines pures à déposer sur le réseau, 2- maîtriser leurs interactions avec les entités qu'elles sont censées fixer, 3- avoir une méthode de détection sensible et quantitative... Ces 3 points sont résolus pour les puces à ADN mais les difficultés sont présentes pour les puces à protéines ».

Enfin, le prix de revient des détections des autoanticorps par les puces à autoantigènes n'a pas encore été correctement évalué ; il dépendra des technologies utilisées, notamment du matériel nécessaire pour les dépôts, la lecture et l'interprétation et de la finalité (recherche ou utilisation en routine).

Même si peu d'études sont actuellement disponibles concernant l'étude des maladies auto-immunes [13], les technologies basées sur les biopuces vont être dans les prochaines décades d'un grand apport pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués et pour leur traitement, tant par l'usage des puces à ADN pour l'étude des génomes [1] que par celui des puces à protéines pour l'étude du protéome, des cytokines et autres molécules de la signalisation cellulaire [2] ou l'identification de nouveaux autoantigènes.

Références

- [1] AHMED SS, TAN FK.
Identification of novel targets in scleroderma: update on population studies, cDNA arrays, SNP analysis, and mutations.
Curr Opin Rheumatol 2003 ; 15 : 766-71.
- [2] CHAN SM, ERMANN J, SU L, FATHMAN CG, UTZ PJ.
Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways.
Nat Med 2000 ; 10 : 1390-6.
- [3] CROW MK, WOHLGEMUTH J.
Microarray analysis of gene expression in lupus.
Arthritis Res Ther 2003 ; 5 : 279-87.
- [4] ESPINA V, WOODHOUSE EC, WULFKUHLE J, ASMUSSEN HD, PETRICCOIN EF III, LIOTTA LA.
Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies.
J Immunol Methods 2004 ; 290 : 121-33.
- [5] FENG Y, KE X, MA R, CHEN Y, HU G, LIU F.
Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases.
Clin Chem 2004 ; 50 : 416-22.
- [6] HAAB BB, DUNHAM MJ, BROWN PO.
Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions.
Genome Biol 2001 ; 2 : research0004.1-0004.13.

- [7] HIEPE F, HENTSCHEL C, SCHULTE-PELKUM J, KREUTZBERGER J, SCHOESSLER W.
Development of a sensitive and reliable biochip for detection of autoantibodies in rheumatic diseases.
Autoimmunity Rev 2004 ; 3 Suppl 2 : 12.
- [8] HUEBER W, UTZ PJ, STEINMAN L, ROBINSON WH.
Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease.
Arthritis Res 2002 ; 4 : 290-5.
- [9] JOOS TO, SCHRENK M, HÖPFL P, KRÖGER K, CHOWDHURY U, STOLL D, *et al.*
A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics.
Electrophoresis 2000 ; 21 : 2641-50.
- [10] JORDAN B.
Puces-actualités.
Med Sci (Paris) 2002 ; 18 : 297-301.
- [11] KUSNEZOW W, HOHEISEL JD.
Antibody microarrays: promises and problems.
Biotechniques 2002 ; Suppl Dec : 14-23.
- [12] MACBEATH G, SCHREIBER SL.
Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination.
Science 2000 ; 289 : 1760-3.
- [13] MOSER KL, GAFFNEY PM, GRANDITS ME, EMAMIAN ES, MACHADO DB, BÆCHLER EC, *et al.*
The use of microarrays to study autoimmunity.
J Invest Dermatol 2004 ; 9 Suppl : 18-22.
- [14] ROBINSON WH, DIGENNARO C, HUEBER W, HAAB BB, KAMACHI M, DEAN EJ, *et al.*
Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses.
Nature Med 2002 ; 8 : 295-301.
- [15] ROBINSON WH, STEINMAN L, UTZ PJ.
Protein arrays for autoantibody profiling and fine-specificity mapping.
Proteomics 2003 ; 3 : 2077-84.
- [16] ROBINSON WH, UTZ PJ, STEINMAN L.
Genomic and proteomic analysis of multiple sclerosis. Opinion.
Curr Opin Immunol 2003 ; 15 : 660-7.
- [17] ROGGE L.
Gene profiling for defining targets for new therapeutics in autoimmune diseases.
Arthritis Res Ther 2003 ; 5 : 47-50.
- [18] UTZ PJ, CHAN SM.
Autoantibody profiling and lymphocyte characterization using autoantigen and lysate arrays. In: CONRAD K, BACHMANN MP, CHAN EKL, FRITZLER MJ, HUMBEL RL, SACK U, SHOENFELD Y, editors. From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. Lengerich: Pabst Science Publishers ; 2004. p. 473-83.

REFERENCES

La technologie Luminex® : application à la recherche des autoanticorps

Nils-Olivier OLSSON, Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire, BP 77908, 21079 Dijon Cedex
E-mail : nils.olsson@chu-dijon.fr

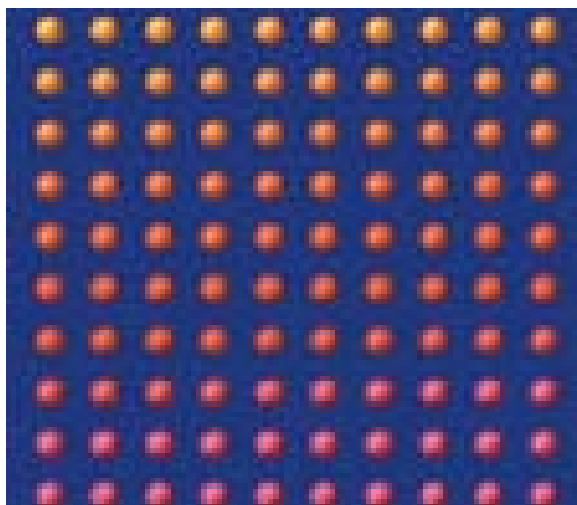
L'intérêt croissant porté aux maladies auto-immunes et aux autoanticorps entraîne une augmentation importante des analyses de sérologie auto-immune. Pour faire face à cette inflation, aggravée par la réduction légale du temps de travail (35 heures), l'automatisation de ces analyses s'impose de plus en plus. De nombreux appareils sont disponibles pour automatiser les techniques ELISA, qu'il s'agisse de modules séparés (diluteurs/distributeurs, incubateurs, laveurs, lecteurs) ou d'automates plus ou moins complets. Néanmoins, le rendement de ces automates est limité. Dans les années 90, la firme Luminex® Corp (Austin, Texas) [<http://www.luminexcorp.com>] a développé une technologie analytique originale, dérivée de la cytométrie en flux, permettant d'analyser simultanément un grand nombre de molécules différentes dans un même échantillon. Plusieurs fabricants de réactifs ont acquis une licence auprès de Luminex® pour adapter cette technologie aux recherches d'autoanticorps. C'est le cas pour quatre firmes présentes sur le marché français : BIO-RAD avec le BioPlex™ 2200, BMD avec le système FIDIS™, INOVA (distribué par MENARINI) avec le système QUANTA Plex™ et Zeus (distribué par InGen) avec le système AtheNA Multi-Lyte™.

PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE LUMINEX®

Il s'agit d'un système analytique multiplex (technologie xMAP® : Multiple Analyte Profile). Il repose sur trois éléments principaux : un support solide constitué de microbilles, des marqueurs fluorescents, et un fluorimètre en flux.

Le support analytique est représenté par des microbilles en polystyrène de 5,6 mm de diamètre. Les fonctions carboxyliques de ces billes permettent de fixer de façon covalente différents types de molécules porteuses de groupements aminés : antigènes, anticorps, acides nucléiques ou autres types de récepteurs ou de ligands. Le domaine d'application potentiel est donc immense, pourvu que l'on soit capable de réaliser de façon satisfaisante le couplage de la molécule complémentaire de l'analyte [13, 18, 19].

Figure 1 / Codage fluorescent des billes dans le système Luminex®.



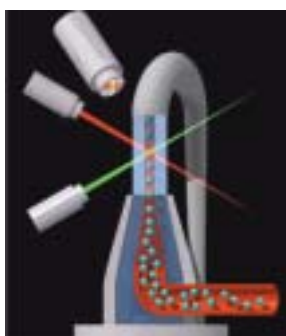
La combinaison de 10 niveaux de concentration d'un fluorochrome orange et d'un fluorochrome rouge permet d'obtenir 100 types de billes.

Pour permettre la détection simultanée de plusieurs analytes, il faut pouvoir distinguer les billes porteuses des molécules complémentaires. Ceci est rendu possible en incorporant dans ces billes des quantités déterminées de deux marqueurs fluorescents, orange et rouge. Dix niveaux de fluorescence de chaque couleur peuvent être combinés, générant cent types de billes (Figure 1). Pour la sérologie auto-immune, un autoantigène différent est fixé sur chaque type de billes, permettant de capturer autant d'autoanticorps différents. Cette fixation est ensuite révélée par un conjugué fluorescent : anticorps anti-immunoglobulines humaines sur lequel est fixé un fluorochrome différent de ceux qui sont incorporés dans les billes.

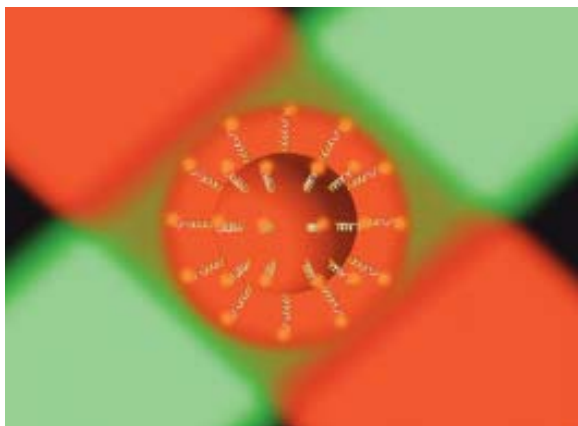
Le troisième élément essentiel est le dispositif de mesure de la fluorescence (Luminex 100™). Il s'agit d'un fluorimètre en flux, abusivement appelé cytomètre en flux, puisque cet appareil n'analyse pas de cellules. Au fluorimètre proprement dit est associée une pompe de circulation (Luminex SD™). La suspension de billes est entraînée par une veine liquide et les billes passent l'une après l'autre dans le trajet de deux faisceaux lasers (Figure 2). L'analyse de la lumière diffractée latéralement (SSC : side scatter) permet de détecter les doublets de billes, qui seront automatiquement exclus du comptage par le logiciel d'acquisition des données. Par ailleurs, les deux lasers permettent l'analyse simultanée des différents fluorochromes associés à une même bille. Le premier laser (635 nm) excite les colorants internes orange et rouge qui émettent à deux longueurs d'onde très différentes, ce qui permet d'identifier la bille, donc l'autoanticorps qu'elle a pu capturer. Le deuxième laser (532 nm) excite le fluorochrome du conjugué qui s'est fixé à la surface de la bille au cours de la réaction, permettant de quantifier l'autoanticorps. Ce fluorochrome est en général la phycoérythrine (PE) : elle se caractérise par un rendement quantique élevé, une faible photosensibilité et une bonne stabilité.

Dans sa configuration classique, deux autres éléments viennent compléter ce système : d'une part, un passeur d'échantillon (Luminex YYP™), placé sous le fluorimètre, qui permet d'automatiser l'étape de lecture ; d'autre part, un logiciel informatique qui pilote l'ensemble et enregistre les mesures de fluorescence (Figure 3).

Figure 2 / Analyse des billes dans le fluorimètre en flux.



Chaque bille passe
simultanément dans
le faisceau des deux lasers.



Le laser rouge identifie la bille (donc l'autoantigène)
par sa fluorescence intrinsèque, et le laser vert mesure
la quantité de conjugué (donc d'autoanticorps) fixé
à sa surface.

Figure 3 / le système Luminex.



A : Fluorimètre (Luminex 100™).
B : Passeur d'échantillons (Luminex XYP™).
C : Pilote informatique.

MODALITÉS PRATIQUES D'UTILISATION POUR LA RECHERCHE DES AUTOANTICORPS

À l'exception du système Bioplex™ 2200, les réactions se déroulent dans des cupules en plastique comparables aux classiques microplaques utilisées en ELISA.

Les analyses sont en général réalisées sur des sérums très dilués (entre 1/200 et 1/1000 selon les fabricants). Les dilutions impor-

tantes doivent être effectuées en deux étapes afin de ne pas avoir à mesurer un volume d'échantillon trop faible.

Les billes doivent être soigneusement remises en suspension dans l'échantillon dilué. C'est une étape critique pour laquelle l'un des fabricants préconise de soniquer la suspension avant de la distribuer, un autre ne recommandant qu'une simple agitation au vortex. Dans les troussees proposées par un troisième fabricant, les billes sont pré-distribuées dans les puits et remises en suspension dans l'échantillon dilué à l'aide d'une pipette automatique ou d'un diluteur/distributeur.

Les analyses se déroulent en deux étapes : par rapport aux techniques ELISA classiques, on économise le temps de l'étape de chromogénèse. La durée des incubations des billes avec les échantillons puis avec le conjugué est comparable à celle des techniques ELISA. En revanche, il n'est pas toujours nécessaire d'effectuer un lavage entre l'incubation des billes avec le sérum et l'incubation avec le conjugué. Deux fabricants proposent en effet des réactifs permettant une addition directe du conjugué dans le mélange réactionnel. Les avantages sont évidents : simplicité de manipulation, gain de temps, automatisation facile. Dans une autre gamme de réactifs (FIDIS™), les billes sont lavées : les réactions sont effectuées dans des plaques à fond semi-perméable qui sont placées sur un dispositif d'aspiration pour l'étape de lavage.

Pour l'étape de lecture, la plaque est placée dans le passeur d'échantillon situé sous le fluorimètre. Cette étape est donc entièrement automatique. La définition du nombre de billes de chaque type qui doivent être comptées (au moins 100), ainsi que le mode de calibration des analyses, sont propres à chaque fabricant de réactifs. La grande étendue du domaine de mesure du fluorimètre permet de s'affranchir des redilutions qui sont éventuellement réalisées dans les techniques ELISA classiques pour les échantillons donnant des résultats hors gamme. Les comptages sont traités par le logiciel de pilotage du fluorimètre, mais certains fabricants complètent ce dispositif par un deuxième logiciel permettant un traitement mieux adapté des résultats.

Le système Bioplex™ 2200 diffère des autres par différents points. Il s'agit d'un automate complet qui inclut le fluorimètre en flux. Les réactions ne se déroulent pas dans des puits de microplaques mais dans des cupules. Les billes sont un peu plus grosses (8 microns) que les billes classiques de Luminex, et sont magnétisées, ce qui facilite les étapes de lavage. Les réactions se déroulent à 37 °C, ce qui permet de réduire la durée des incubations (20 et 10 mn).

INTÉRÊT ET LIMITES DE LA TECHNOLOGIE LUMINEX®

Les microbilles font l'objet de multiples applications en cytométrie [12]. Leur utilisation comme support solide pour des dosages immunologiques n'est pas nouvelle : elle a été appliquée dès 1982 au dosage des IgG humaines [11]. Son automatisation avait déjà été proposée il y a quelques années (système Copalis, DiaSorin). Mais l'intérêt majeur de la technologie Luminex est la possibilité d'analyse multiplex, grâce au marquage interne des billes. Il est théoriquement possible d'analyser simultanément, dans un même échantillon biologique, jusqu'à 100 analytes différents.

Néanmoins, pour réaliser une telle prouesse, il faut satisfaire à un certain nombre de conditions. Comme pour tous les systèmes récepteur/ligand utilisant une phase solide, il faut tout d'abord disposer de récepteurs suffisamment spécifiques des ligands recherchés, et parvenir ensuite à coupler tous ces récepteurs sur les billes, sans perte de spécificité et de façon stable. La définition de la matrice liquide dans laquelle se déroule la réaction est également critique, puisqu'elle doit convenir à des couples récepteur-ligand qui peuvent être assez différents. Si les conditions de

capture d'acides nucléiques (amplicons) par des sondes oligonucléotidiques fixées sur les billes sont relativement homogènes, il n'en est pas de même pour la capture d'anticorps par des antigènes très différents. Par ailleurs, on peut s'interroger sur la capacité du fluorimètre à différencier parfaitement des billes qui ne différencieraient que par un niveau de concentration de l'un des deux fluorochromes internes. Les billes sont sensibles à la lumière, en particulier celles qui sont les plus fortement chargées en fluorochromes : leur exposition prolongée à la lumière pourrait rendre leur codage moins précis et perturber leur identification. Enfin les performances des lasers sont sensibles aux variations de température, et il est souhaitable de les recalibrer fréquemment.

La possibilité de réaliser plusieurs analyses simultanément sur un même sérum et dans la même cupule diminue considérablement le temps de travail. Néanmoins, l'étape de mesure est plus longue que dans les techniques ELISA : alors qu'un lecteur de microplaque effectue la mesure photométrique de 96 puits en trois secondes, il faut 10 à 90 secondes au fluorimètre en flux pour acquérir un nombre suffisant de mesures de fluorescence dans un mélange réactionnel. Ce temps de comptage est évidemment fonction du nombre d'analytes (nombre de billes différentes) mesuré(e)s.

Il faut également souligner que cette étape finale de mesure est la seule qui soit automatisée. Il faut donc envisager l'utilisation en amont d'un automate de dilution/distribution pour la réalisation des étapes réactionnelles. Cette automatisation est évidemment plus facile si les analyses ne nécessitent pas de lavage. Les sociétés BMD, Menarini et InGen proposent des plate-formes préanalytiques qui permettent d'automatiser plus ou moins complètement ces étapes. Avec le BioPlex™ 2200, BIO-RAD a fait le choix d'une automatisation totale, le fluorimètre étant intégré à l'automate.

De nombreuses firmes américaines, européennes ou asiatiques ont déjà développé des réactifs utilisables sur le système Luminex, en particulier dans les domaines des cytokines, du système HLA [6], des hormones peptidiques, du génotypage moléculaire et la détection de mutations ponctuelles (SNP : single nucleotide polymorphism). Pour les autoanticorps, les quatre fabricants implantés sur le marché français ont développé des trousse de réactifs pour la détection de différents panels d'autoanticorps : anticorps antinucléaires, anticorps antithyroïdiens, facteurs rhumatoïdes, anticorps associés à l'intolérance au gluten, anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. De nombreuses évaluations de ces réactifs ont déjà été publiées [1, 3, 4, 9, 15-17]. Certains de ces réactifs sont déjà disponibles en France, d'autres devraient bénéficier bientôt du marquage CE. D'autres paramètres ont été développés par des firmes étrangères mais ne sont pas disponibles en France : c'est le cas pour les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* et les anticorps anti-bêta-2-gpI (Rules Based Medicine).

Dans ce domaine de l'auto-immunité, l'intérêt de ces analyses multiparamétriques est évident. En effet, dans de nombreuses pathologies auto-immunes, il est nécessaire ou souhaitable de rechercher plusieurs autoanticorps différents. C'est le cas de la polyarthrite rhumatoïde où l'on a coutume de rechercher en parallèle des facteurs rhumatoïdes de spécificité humaine et animale qui ont des performances cliniques (sensibilité, spécificité) un peu différentes. La recherche d'autres anticorps plus spécifiques, comme les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP), leur est de plus en plus souvent associée. Il en est de même pour les anticorps anti-ENA : après une éventuelle première étape de dépistage global, on recherche volontiers en parallèle les quatre, cinq ou six spécificités les plus fréquentes. Pour le syndrome des anti-phospholipides, il peut être utile d'associer à la recherche des classiques anti-cardiolipides celle des anti- β 2-glycoprotéine I, voire d'anticorps dirigés contre d'autres phospholipides ou d'autres cofacteurs protéiques. Le diagnostic et le suivi de la maladie coeliaque font généralement appel à plusieurs anti-

corps, dont les anti-gliadines et les anti-transglutaminases tissulaires qui peuvent être recherchés par ce type de technique. De plus, la possibilité de rechercher des panels étendus d'autoanticorps peut déboucher sur l'identification de nouveaux profils d'intérêt clinique [8].

Un autre intérêt de cette technologie est son caractère ouvert. Si elle n'a pénétré que récemment dans les laboratoires d'analyses médicales, elle est présente depuis longtemps les laboratoires de recherche qui ont développé de nombreuses applications dans le domaine des cytokines [5], de la sérologie infectieuse [2, 10, 14], du génotypage bactérien [20], des maladies génétiques [7], ... Rien n'empêche un laboratoire situé à la frontière entre ces deux pôles, comme un laboratoire hospitalo-universitaire, de mettre au point lui-même la détection d'autoanticorps particuliers en achetant séparément les billes, les antigènes et le conjugué. Le logiciel de pilotage du fluorimètre fourni par Luminex® n'interdit pas l'utilisation de réactifs non commerciaux. La limite risque plutôt de venir des firmes qui développent les applications analytiques et qui pourraient associer au système un logiciel de pilotage et d'exploitations des résultats qui ne permettrait de n'utiliser que leurs réactifs.

Autre limite : dans l'état actuel des choses, cette technologie ne permet pas de détecter séparément des anticorps d'isotypes différents dans le même mélange réactionnel. Ainsi, la recherche dans un même sérum des IgA et des IgG anti-gliadine doit être effectuée dans deux puits distincts. Luminex® Corporation pourrait proposer prochainement un fluorimètre équipé de trois lasers qui supprimerait cette limite en autorisant la détection de deux conjugués porteurs de fluorochromes différents.

LA TECHNOLOGIE LUMINEX® PARVIENDRA-T-ELLE À S'IMPOSER POUR LA SÉROLOGIE AUTO-IMMUNE ?

Si l'utilisation de cette technologie multiplex pour la recherche des autoanticorps est séduisante *a priori*, elle se heurte à un certain nombre de difficultés.

Elles sont d'abord d'ordre économique. En effet, le coût de l'appareillage et des réactifs n'est pas négligeable. Les quantités d'antigènes utilisées dans ces tests sont pourtant nettement inférieures à celles que nécessitent les techniques classiques comme l'ELISA, mais l'utilisateur doit évidemment payer l'investissement en recherche et développement effectué par les sociétés concernées.

Par ailleurs, la réalisation systématique de panels d'analyses peut également être une source de difficultés en termes de remboursement. Si l'on prend l'exemple des anticorps antinucléaires, la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale autorise le biologiste à effectuer de sa propre initiative la recherche d'anticorps anti-ADN natif lorsque l'immunofluorescence a mis en évidence un titre élevé d'anticorps antinucléaires. Mais elle ne lui donne pas explicitement le droit de rechercher de la même façon des anti-ENA, des anti-histones, des anti-ribosomes, des anti-CENP-B, ... Bien que cette démarche puisse se justifier sur le plan médical, la facturation de tels examens non prescrits peut être condamnée par les caisses d'assurance-maladie. Plusieurs démarches peuvent être envisagées pour pallier cette difficulté. Une première solution est de diversifier les panels d'anticorps afin de faire correspondre le mieux possible les examens réalisés avec la prescription. De fait, l'un des fabricants présents sur le marché français (INOVA) propose quatre panels différents pour la recherche des anticorps antinucléaires. Il est clair néanmoins que la multiplication des panels complique la gestion des analyses et des réactifs. Une autre solution serait d'utiliser toujours un même panel regroupant de nombreux anticorps et de ne facturer que ceux qui ont été prescrits. Ceci suppose que le coût de ces réactifs soit suffisamment bas.

Devant cette possibilité de rechercher simultanément plusieurs anticorps différents dans un même sérum, le biologiste pourrait être tenté de les multiplier. La question de la définition des profils d'anticorps les plus pertinents se pose donc. À titre d'exemple, est-il justifié de rechercher simultanément des anticorps anti-ADN natif, anti-chromatine (anti-nucléosomes) et anti-histones ? Est-il justifié de rechercher des anticorps dirigés contre tous les peptides des antigènes Sm et RNP ?

D'autre part, si la recherche d'un panel d'autoanticorps peut être utile dans le bilan initial d'une maladie auto-immune systémique, il n'en est pas de même, par exemple, pour le suivi d'un lupus, où le seul taux des anticorps anti-ADN natif (ou des anti-nucléosomes) pourrait suffire.

On peut également s'interroger sur la place que pourraient prendre certains de ces tests multiplex dans la stratégie de détec-

tion des autoanticorps. Ainsi, dans l'un des panels actuellement proposés pour aider au diagnostic des connectivites, certaines billes sont revêtues d'un extrait antigénique « total » de cellules HEp-2. Certains pourraient être tentés d'utiliser exclusivement ce panel en abandonnant la recherche des anticorps antinucléaires par immunofluorescence. Il faut réaffirmer que l'immunofluorescence peut fournir de très nombreux renseignements et doit garder sa place en première intention, la détection d'un panel d'anticorps antinucléaires venant en complément. La question se pose également pour les ANCA. La forte sensibilité du système BioPlex™ 2200 pour la détection des anti-MPO et anti-PR3 a fait suggérer qu'elle pourrait être réalisée de cette façon, en première intention, l'immunofluorescence n'étant utilisée que pour contrôler les résultats positifs [3].

CONCLUSION

Les technologies multiplex qui apparaissent sont séduisantes. Qu'elles utilisent des microbilles ou des puces à protéines, elles offrent la possibilité de détecter simultanément un grand nombre d'analytes. Elles peuvent être appliquées à une multitude de systèmes récepteur/ligands et sont donc amenées à se développer de façon importante en biologie, en particulier en biologie médicale. La place que prendront ces technologies dans le domaine de la sérologie auto-immune au cours des prochaines années dépend en particulier de leur coût, de la nature et de la qualité des antigènes utilisés, et des profils d'autoanticorps qui seront proposés. Enfin, il appartiendra bien sûr aux biologistes d'évaluer la fiabilité et les performances des réactifs qui leur seront proposés.

Références

- [1] ABREU I, BASTOS A, CARDOSO C, RIBEIRO H, COUCEIRO N, BODAS A, *et al.*
Multicentre evaluation of the new multiplex assay FIDIS Connective. Comparison with conventional methods. In: CONRAD K, BACHMANN MP, CHAN EKL, FRITZLER MJ, HUMBEL RL, SACK U, SHOENFELD Y, editors. From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. Lengerich: Pabst Science Publishers ; 2004. p. 467-8.
- [2] BELLISARIO R, COLINAS RJ, PASS KA.
Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay.
Early Hum Dev 2001 ; 64 : 21-5
- [3] BINDER SR, WATKINS M, PRESTIGIACOMO A, HOMBURGER H.
ANCA immunoassays: evaluation of a multiplexed MPO and PR3 immunoassay on the BioPlex™ 2200.
Autoimmunity Rev 2004 ; 3 Suppl 2 : 91.
- [4] BULIARD A, FORTENFANT F, GHILANI-DALBIN P, MUSSET L, OKSMAN F, OLSSON NO.
Apport de la technologie Luminex pour la détection de neuf autoanticorps associés aux connectivites. Résultats d'une étude multicentrique.
Ann Biol Clin. 2005 ; 63 : 51-8.
- [5] CARSON RT, VIGNALI DA.
Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay.
J Immunol Methods 1999 ; 227 : 41-52.
- [6] CESBRON-GAUTIER A, SIMON P, ACHARD L, CURY S, FOLLEA G, BIGNON D.
Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA.
Ann Biol Clin 2004 ; 1 : 93-8.
- [7] DUNBAR SA, JACOBSON JW.
Application of the Luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: a pilot study.
Clin Chem 2000 ; 46 : 1498-500.
- [8] FRITZLER MJ.
New technologies in the detection of autoantibodies : evaluation of addressable laser beads immunoassays. In: CONRAD K, BACHMANN MP, CHAN EKL, FRITZLER MJ, HUMBEL RL, SACK U, SHOENFELD Y, editors. From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. Lengerich: Pabst Science Publishers ; 2004. p. 449-59.
- [9] GILBURD B, ABU-SHAKRA M, SHOENFELD Y, GIORDANO A, BOCCI EB, DELLE MONACHE F, *et al.* Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjogren's syndrome: the ANA evaluation – a homogeneous, multiplexed system.
Clin Dev Immunol 2004 ; 11 : 53-6.
- [10] JANI IV, JANOSSY G, BROWN DWG, MANDY F.
Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings.
Lancet Infect Dis 2002 ; 2 : 243-50.
- [11] LISI PJ, HUANG CW, HOFFMAN RA, TEIPEL JW.
A fluorescence immunoassay for soluble antigens employing flow cytometric detection.
Clin Chim Acta 1982 ; 120 : 171-9.
- [12] LIZARD G, DUVILLARD L, WEDEMEYER N, MULLER C, GHIRINGELLI F, CESBRON A, *et al.*
Microbilles, nanobilles et cytométrie : applications à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire.
Pathol Biol 2003 ; 51 : 418-27.

[13] MOALIC V, MERCIER B, FEREC C.
Technologie Luminex™ : principe, applications et perspectives.
Immunoanal Biol Spec 2004 ; 19 : 181-7.

[14] PICKERING JW, MARTINS TB, GREER RW, SCHRODER MC,
ASTILL ME, LITWIN CM, *et al.*
A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies
to pneumococcal capsular polysaccharides.
Am J Clin Pathol 2002 ; 117 : 589-96.

[15] PRESTIGIACOMO T, HUMBEL RL, LARIDA B, BINDER SR.
Multiplexed analysis of thirteen autoantibodies using the BioPlex™
2200 fully automated immunoassay analyser. In: CONRAD K,
BACHMANN MP, CHAN EKL, FRITZLER MJ, HUMBEL RL, SACK U,
SHOENFELD Y, editors. From animal models to human genetics:
research on the induction and pathogenicity of autoantibodies.
Lengerich: Pabst Science Publishers ; 2004. p. 463-6.

[16] TOZZOLI R, KODERMAZ G, BIZZARO N, BAGNASCO M,
VILLALTA D, TONUTTI E.
The usefulness of a combined, simultaneous assay of anti-Tg
and anti-TPO antibodies in autoimmune thyroid disease using
a multiplexed automated immunometric system.
Autoimmunity Rev 2004 ; 3 Suppl 2 : 144.

[17] TOZZOLI R, KODERMAZ G, TONUTTI E, BIZZARO N,
VILLALTA D.
Diagnostic accuracy of the FIDIS multiplex immunoassay system
for the detection of gliadin and transglutaminase antibodies in celiac
disease.
Autoimmunity Rev 2004 ; 3 Suppl 2 : 127.

[18] VIGNALI DAA.
Multiplexed particle-based flow cytometric assays.
J Immunol Methods 2000 ; 243 : 243-55.

[19] WEDEMEYER N, POTTER T.
Flow cytometry: an "old" tool for novel applications in medical
genetics.
Clin Genet 2001 ; 60 : 1-8.

[20] YE F, LI MS, TAYLOR JD, NGUYEN Q, COLTON HM,
CASEY WM, *et al.*
Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed
human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial
identification.
Hum Mutat 2001 ; 17 : 305-16.

REFERENCES

Apport de l'analyse sérologique du protéome dans l'identification des autoantigènes

Éric BALLOT, Catherine JOHANET, *Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie Biologiques, hôpital Saint-Antoine, Paris*

Plus de 200 autoanticorps (Ac) sont actuellement décrits. Le développement récent des puces à protéines et des techniques fluorométriques en flux utilisant des antigènes (Ag) couplés à des microbilles implique la connaissance approfondie des autoAg pouvant entrer dans les panels de détection, panels susceptibles chacun de compter plusieurs dizaines à plusieurs centaines d'Ag. C'est dans ce cadre que peut prendre place la puissance de l'analyse protéomique appliquée à la détection des autoAg.

I/ PRINCIPES GÉNÉRAUX DE L'ANALYSE SÉROLOGIQUE DU PROTÉOME DANS L'IDENTIFICATION DES AUTOANTIGÈNES (Figure 1)



Figure 1/ Identification d'autoAg par analyse sérologique du protéome. Principe général.

La première étape est la séparation par électrophorèse bidimensionnelle de protéines de fractions cellulaires. À partir du gel est réalisé un immunoblot bidimensionnel [6]. La comparaison des immunoblots obtenus à partir de sérums de contrôle et à partir de sérums de malades ayant une pathologie auto-immune permet de repérer les spots spécifiques des sérums de malades. Ce repérage peut éventuellement faire appel à des logiciels d'analyse d'image et à des logiciels de traitement statistique. La reproductibilité de l'électrophorèse bidimensionnelle a considérablement progressé ces dernières années, en particulier grâce à l'apport des immobilines®, couplage covalent entre l'acrylamide du gel et les ampholytes assurant le gradient de pH dans les isoélectrofocalisations.

La deuxième étape consiste à repérer sur le gel de polyacrylamide, coloré au bleu de Coomassie par exemple, les spots d'intérêt de l'immunoblot.

Ces spots sont excisés du gel, et après plusieurs étapes, les protéines qu'ils contiennent sont protéolysées par une solution de trypsine. Les fragments tryptiques résultants sont alors extraits du morceau de gel, concentrés et dessalés avant d'être amenés en phase gazeuse pour l'analyse proprement dite par spectrométrie de masse [18]. L'identification peut faire appel soit à une recherche par homologie de masse, soit à une recherche par homologie de séquence.

II/ IDENTIFICATION PAR HOMOLOGIE DE MASSE (Figure 2)

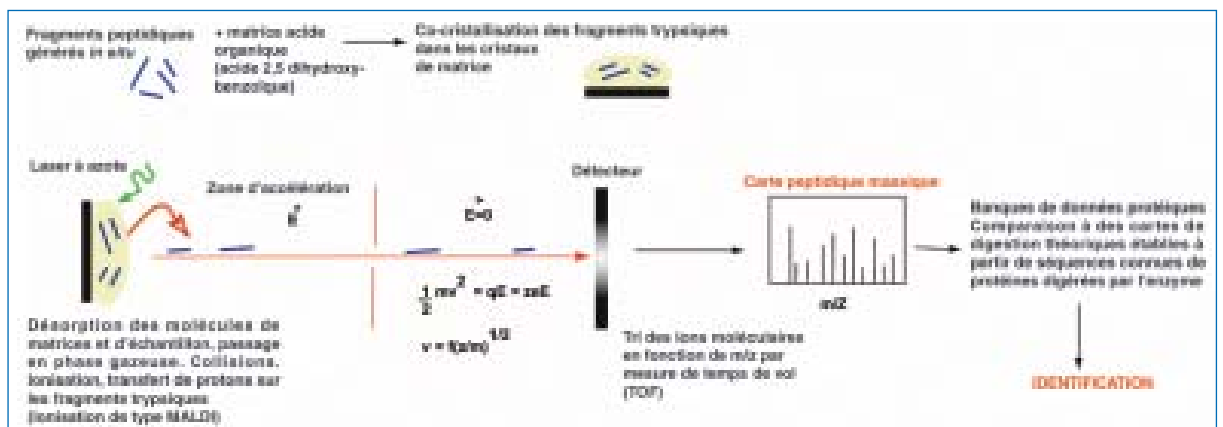


Figure 2/ Spectrométrie de type MALDI-TOF et identification par homologie de séquence.

Les fragments de digestion trypsique sont cristallisés dans une matrice organique sur une plaque métallique. Ils sont désorbés de cette matrice grâce à l'énergie d'un faisceau laser qui permet de les sublimer et de les ioniser (ionisation de type MALDI, *matrix assisted laser desorption/ionisation*). L'analyseur de masse associé avec une source MALDI est le plus souvent un appareil de type temps de vol (TOF, *time of flight*) qui apprécie le temps mis par les fragments protéolytiques pour arriver à un détecteur. Ce temps

est proportionnel à l'énergie cinétique acquise dans la première partie de l'analyseur où règne un champ électrique, et donc au rapport de la masse sur la charge du fragment trypsique. On obtient ainsi une liste des masses des produits de digestion trypsique de la protéine présente dans le spot d'intérêt. Cette liste de masses est comparée informatiquement à des listes de masses théoriques établies par simulation d'une digestion protéolytique de toutes les protéines contenues dans les banques de données [7, 14].

III/ IDENTIFICATION PAR HOMOLOGIE DE SÉQUENCE (Figure 3)

Dans cette technique, les fragments de la digestion protéolytique sont ionisés par électronébulisation le plus souvent (technique ESI, *electrospray ionisation*). Les ions moléculaires ainsi générés entrent dans un premier analyseur où ils sont sélectionnés selon leurs trajectoire, fonction du rapport masse sur charge. Ces ions sélectionnés entrent ensuite dans une chambre de collision où ils sont fragmentés au niveau des liaisons peptidiques. Les masses

des différents fragments sont analysées par un analyseur de type TOF. La différence de masse entre deux fragments sera alors d'un acide aminé, donnant accès au nom de cet acide aminé. On peut ainsi obtenir une courte séquence. Si cette séquence recouvre plus de 5 à 6 acides aminés, elle permet l'identification de la protéine sélectionnée par recherche par homologie de séquence protéique dans les banques de données [7, 14].

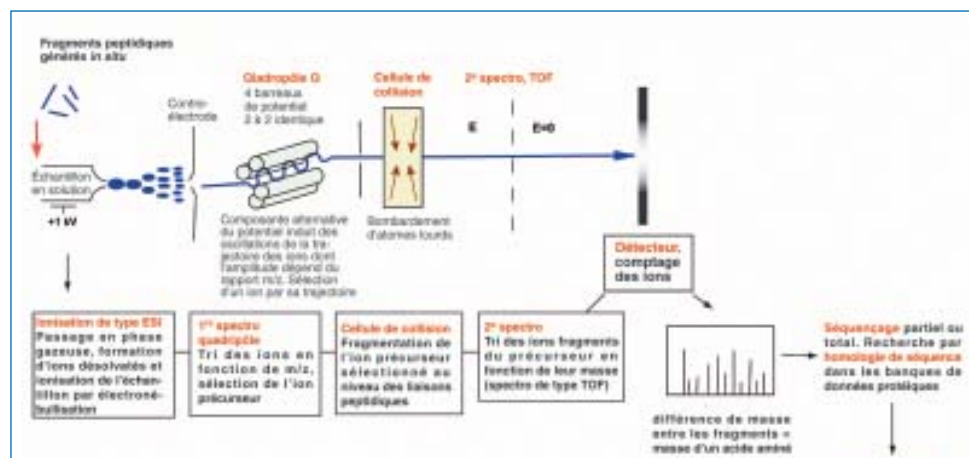


Figure 3/ Spectrométrie tandem de type ESI-Q-TOF et identification par homologie de masse.

IV/ AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE L'ANALYSE SÉROLOGIQUE DU PROTÉOME DANS L'IDENTIFICATION DES AUTOANTIGÈNES

L'identification des cibles antigéniques des autoAc a considérablement progressé ces quinze dernières années grâce en partie au développement de la technologie de l'ADN recombinant. Mais les ADNc utilisés dans les immunocriblages ne recouvrent pas forcément l'ADN *in vivo*, quant à la régulation ou au niveau d'expression des gènes. Il est maintenant établi qu'une séquence isolée d'ADNc ne préjuge pas du niveau d'expression de la protéine *in vivo* [9]. De plus, il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant être à l'origine d'isoformes et rentrant dans la composition de la structure épitopique. Ces modifications peuvent dépendre du vecteur d'expression. C'est du fait de ces restrictions que l'identification des autoAg par analyse protéomique trouve toute son utilité, puisqu'elle permet d'identifier des protéines telles qu'elles se présentent dans la cellule, à leur niveau d'expression et avec leurs modifications post-traductionnelles. Il pourrait ainsi être intéressant de valider les cibles de certains autoAc, comme les anticorps appelés anti-SS-A/Ro52 qui en fait ne réagissent pas avec la protéine native SS-A/Ro mais avec la protéine TRIM21.

Cette technologie est encore peu usitée en auto-immunité mais a déjà permis d'identifier les cibles de différents autoAc, en particulier dans l'hépatite auto-immune [2, 10], l'ostéoarthritis [22], la polyarthrite rhumatoïde [17], la maladie cœliaque [20], des uvéites [19], l'encéphalopathie d'Hashimoto [15], le lupus [21], des stérilités auto-immunes [3, 4], la maladie de Behçet [11, 13], les cardiomyopathies avec Ac anti-M7 [5], la sclérose en plaque [1], ainsi que dans des tumeurs où apparaissent des autoAc [12].

Cette approche technologique a cependant des limites. L'électrophorèse bidimensionnelle, préalable actuellement quasi incontournable, ne permet souvent pas, dans des conditions techniques standards, une migration satisfaisante des protéines de membranes et des protéines très basiques. Alors qu'il existe dans le génome environ 100 000 gènes et qu'une lignée cellulaire donnée en exprime environ 10 000, une électrophorèse bidimensionnelle de bonne qualité ne sera à même de séparer que 1 500 protéines [8, 16]. Pour cibler les protéines d'intérêt, il est donc nécessaire de réaliser une prépurification préalable, par exemple par un fractionnement cellulaire de bonne qualité. Il n'en reste pas moins vrai que seules les protéines de 10 à 300 kilodaltons seront séparées sur gels de polyacrylamide. Par ailleurs, l'identification par interrogation de banques de données ne peut être réalisée et valide que si les protéines sont déjà connues et entrées dans les banques avec des séquences exactes, ce qui n'est pas toujours le cas. Les fractions cellulaires à la base de la préparation antigénique doivent être répétées et les profils de migration reproductibles. Enfin, un regard critique doit être apporté sur les identifications obtenues. L'analyse protéomique fournit des pistes de travail, mais une validation des résultats, par utilisation d'Ag purifié par exemple, semble nécessaire.

Cette technique ne peut que concourir à une connaissance précise des cibles antigéniques dans le but d'améliorer le diagnostic biologique à travers la création de nouveaux tests et de mieux connaître la physiopathologie des maladies auto-immunes, encore largement inconnue.

Références

- [1] ALMERAS L, LEFRANC D, DROBECQ H, DE SEZE J, DUBUCQUOI S, VERMERSCH P, *et al.*
New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis.
Proteomics 2004 ; 4 : 2184-94.
- [2] BALLOT E, BRUNEEL A, LABAS V, JOHANET C.
Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis.
Clin Chem 2003 ; 49 : 634-43.
- [3] BOHRING C, KRAUSE E, HABERMANN B, KRAUSE W.
Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease.
Mol Hum Reprod 2001 ; 7 : 113-8.
- [4] CARLSSON L, RONQUIST G, NILSSON BO, LARSSON A.
Dominant prostatic immunogens for sperm-agglutinating autoantibodies of infertile men.
J Androl 2004 ; 25 : 699-705.
- [5] CICEK G, SCHILTZ E, HESS D, STAIGER J, BRANDSCH R.
Analysis of mitochondrial antigens reveals inner membrane succinate dehydrogenase flavoprotein subunit as autoantigen to antibodies in anti-M7 sera.
Clin Exp Immunol 2002 ; 128 : 83-7.
- [6] GÖRG A, WEISS W, DUNN MJ.
Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.
Proteomics 2004 ; 4 : 3665-85.
- [7] GRAHAM DR, ELLIOTT ST, VAN EYK JE.
Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening.
J Physiol 2005 ; 563 : 1-9.
- [8] GYGI SP, CORTHALS GL, ZHANG Y, ROCHON Y, AEBERSOLD R.
Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.
Proc Natl Acad Sci USA 2000 ; 97 : 9390-5.
- [9] GYGI S, ROCHON Y, FRANZA R, AEBERSOLD R.
Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.
Mol Cell Biol 1999 ; 3 : 1720-30.
- [10] HUGUET S, LABAS V, DUCLOS-VALLEE JC, BRUNEEL A, VINH J, SAMUEL D, JOHANET C, BALLOT E.
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 identified as an autoantigen in autoimmune hepatitis by proteome analysis.
Proteomics 2004 ; 4 : 1341-5.
- [11] LEE KH, CHUNG HS, KIM HS, OH SH, HA MK, BAIK JH, *et al.*
Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease.
Arthritis Rheum 2003 ; 48 : 2025-3.
- [12] LE NAOUR F.
Contribution of proteomics to tumor immunology.
Proteomics 2001 ; 1 : 1295-302.
- [13] MOR F, WEINBERGER A, COHEN IR.
Identification of alpha-tropomyosin as a target self-antigen in Behçet's syndrome.
Eur J Immunol 2002 ; 32 : 356-65.
- [14] MORIKIS D, LAMBRIS JD.
Physical methods for structure, dynamics and binding in immunological research.
Trends Immunol 2004 ; 25 : 700-7.
- [15] OCHI H, HORIUCHI I, ARAKI N, TODA T, ARAKI T, SATO K, *et al.*
Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy.
FEBS Lett 2002 ; 528 : 197-202.
- [16] PANDEY A, MANN M.
Proteomics to study genes and genomes.
Nature 2000 ; 405 : 837-46.
- [17] SAULOT V, VITTECOQ O, CHARLIONET R, FARDELLONE P, LANGE C, MARVIN L, *et al.*
Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 2002 ; 46 : 1196-1201.
- [18] SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M.
Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.
Anal Chem 1996 ; 68 : 850-8.
- [19] STEMPEL D, SANDUSKY H, LAMPI K, CILLUFFO M, HORWITZ J, BRAUN J, *et al.*
Beta B1-crystallin: identification of a candidate ciliary body uveitis antigen.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2003 ; 44 : 203-9.
- [20] STULIK J, HERNYCHOVA L, PORKERTOVA S, POZLER O, TUCKOVA L, SANCHEZ D, *et al.*
Identification of new celiac disease autoantigens using proteomic analysis.
Proteomics 2003 ; 3 : 951-6.
- [21] THEBAULT S, GILBERT D, HUBERT M, DROUOT L, MACHOUR N, LANGE C, *et al.*
Orderly pattern of development of the autoantibody response in (New Zealand White x BXSB)F1 lupus mice: characterization of target antigens and antigen spreading by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.
J Immunol 2002 ; 169 : 4046-53.
- [22] XIANG Y, SEKINE T, NAKAMURA H, IMAJOH-OHMI S, FUKUDA H, NISHIOKA K, *et al.*
Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis.
Arthritis Rheum 2004 ; 50 : 1511-21.

REFERENCES

16 membres du GEAI

Association GEAI
CHU Hôpital Larrey
Laboratoire d'Immunologie et d'Immunopathologie
49033 ANGERS Cedex 01

Chantal ANDRÉ

Vice-Présidente du GEAI
CHU Henri Mondor
Service d'Immunologie Biologique
51, av. du M.-de-Lattre-de-Tassigny - 94010 CRÉTEIL
Tél. : 01 49 81 28 86 ou 01 49 81 22 98 (sec)
Fax : 01 49 81 28 97
E.mail : chantal.andre@hmn.ap-hop-paris.fr

Alain CHEVAILLER

Trésorier du GEAI
CHU Hôpital Larrey
Laboratoire d'Immunologie et d'Immunopathologie
49033 ANGERS Cedex 01
Tél. : 02 41 35 47 89 ou 02 41 35 35 77
Fax : 02 41 35 47 83
E.mail : alchevailier@chu-angers.fr

Pascale CHRÉTIEN

CHI
Service Hématologie et Immunologie
49, avenue de Verdun - 94000 CRÉTEIL Cedex
Tél. : 01 45 17 53 88 ou 01 45 17 53 33 (sec)
Fax : 01 45 17 53 49
E.mail : pascale.chretien@chicreteil.fr

Andrée ESCANDE

CHU Saint Éloi
Laboratoire d'Immunologie
Avenue Bertin-Sens - 34295 MONTPELLIER Cedex
Tél. : 04 67 33 71 35 - Fax : 04 67 33 71 29
E.mail : a-escande@chu-montpellier.fr

Nicole FABIEN

Docteur
CHU Lyon Sud
Laboratoire d'Auto-Immunité
Bât. 2A - Niveau 2 - 69495 PIERRE-BÉNITE Cedex
Tél. : 04 78 86 66 83 - Fax : 04 78 56 90 60
E.mail : nicole.fabien@chu-lyon.fr

Joëlle GOETZ

CHU Haute-pierre
Laboratoire d'Immunologie
Avenue Molière - 67098 STRASBOURG Cedex
Tél. : 03 88 12 75 26 - Fax : 03 88 12 81 34
E.mail : joelle.goetz@chru-strasbourg.fr

René-Louis HUMBEL

Professeur
Laboratoire Luxembourgeois d'Immunopathologie
L-4149 ESCH-SUR-ALZETTE
Luxembourg
Tél. : 00 352 488 288 380 - Fax : 00 352 488 288 385
E.mail : rlhumbel@llip.lu

Catherine JOHANET

CHU Saint-Antoine
Laboratoire Central d'Immunologie
184, faubourg St-Antoine - 75571 PARIS Cedex 12
Tél. : 01 49 28 20 11 - Fax : 01 49 28 22 92
E.mail : catherine.johanet@sat.ap-hop-paris.fr

Bruno LARIDA

Secrétaire du GEAI
BIO-RAD Laboratories
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547 USA
Tél. : +1 (510) 741-6050 - Fax : +1 (510) 741-5823
E.mail : bruno.larida@bio-rad.com

Jean-Claude MONIER

20, rue de l'Oratoire - 69300 CALUIRE
Tél. et fax : 04 78 29 66 86 (personnel)
E.mail : moniersurf@aol.com

Françoise OKSMAN

Hôpital Rangueil
Laboratoire d'Immunologie
Avenue Jean-Poulhes - 31403 TOULOUSE Cedex 4
Tél. : 05 61 32 34 25 (direct) ou 05 61 32 34 31 (sec)
Fax : 05 61 32 34 30
E.mail : oksman.f@chu-toulouse.fr

Nils Olivier OLSSON

CHU, Hôpital du Bocage
Laboratoire d'Immunologie
2, bd du M.-de-Lattre-de-Tassigny - BP 77908 - 21079 DIJON Cedex
Tél. : 03 80 29 33 72 ou 03 80 29 32 26 (labo)
ou 03 80 29 30 31 (standard)
Fax : 03 80 29 37 87
E.mail : nils.olsson@chu-dijon.fr

Marielle SAN MARCO

Hôpital de la Conception - Pavillon Cornil
Laboratoire d'Immunologie
147, boulevard Baille - 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tél. : 04 91 38 39 70 ou 04 91 38 39 08 ou 39 07 (sec)
Fax : 04 91 38 36 33
E.mail : msanmarco@mail.ap-hm.fr

Jean SIBILIA

CHU Haute-pierre
Service Rhumatologie
67098 STRASBOURG
Tél. : 03 88 12 79 53 ou 03 88 12 79 55
Fax : 03 88 12 81 50
E.mail : jean.sibilia@wanadoo.fr

Marie-France TAILLEFER

Laboratoire BIOCENRE
9, rue d'Hespel
59910 BONDUES
Tél. : 03 20 23 23 52 - Fax : 03 20 23 23 52
E.mail : mftaillefer@nordnet.fr

Laurent TESTE

Secrétaire adjoint du GEAI
BIO-RAD
3, bd R.-Poincaré - 92430 MARNES LA COQUETTE
Tél. : 01 47 95 62 56 - Fax : 01 47 95 62 20
E.mail : laurent.teste@bio-rad.com



Parution bisannuelle

RÉDACTEUR EN CHEF : Jean-Claude MONIER - **ÉQUIPE DE RÉDACTION :** Chantal ANDRÉ, Alain CHEVAILLER, Pascale CHRÉTIEN, Andrée ESCANDE, Joëlle GOETZ, René-Louis HUMBEL, Catherine JOHANET, Françoise OKSMAN, Nils Olivier OLSSON, Marielle SAN MARCO, Jean SIBILIA, Marie-France TAILLEFER

BIO-RAD, 3 bd R. Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette
Directeur de publication : Laurent TESTE
Secrétariat du GEAI : tél. : 01 47 95 62 56 - fax : 01 47 95 62 20
Email : laurent.teste@bio-rad.com

Association GEAI - CHU Hôpital Larrey - Laboratoire d'Immunologie et d'Immunopathologie - 49033 Angers Cedex 01
Site Internet : <http://geai-lesautoanticorps.ifrance.com/geai-lesautoanticorps>
Conception et réalisation GRAPHIC WAY : 01 58 04 90 90

BIO-RAD